

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-005857

(43)Date of publication of application : 10.01.1990

(51)Int.Cl. C12N 5/04
A01H 4/00
A01N 1/02
C12N 15/05
C12N 15/09

(21)Application number : 01-055962 (71)Applicant : CIBA GEIGY AG
(22)Date of filing : 08.03.1989 (72)Inventor : HORN MICHAEL E
HARMS CHRISTIAN T
SHILLITO RAYMOND D

(30)Priority

Priority number : 88 165665 Priority date : 08.03.1988 Priority country : US

(54) REGENERATION OF GRAMINACEOUS PLANT OF SUBFAMILY POOIDEAE FROM PROTOPLAST

(57)Abstract:

PURPOSE: To regenerate a plant of subfamily Puidiae of family Gramineae by culturing a tissue of a pooideae planet in a medium, separating an embryo- forming cell group, removing the cell wall and separating the produced protoplast.

CONSTITUTION: A tissue is separated from a proper part of a pooideae plant such as the base of young inner leaf, unripe germ line, unripe inflorescence, ripe seed and seedling tissue. The separated tissue is cultured in a medium capable of inducing the formation of embryo-forming callus and embryo and periodically subcultured in a fresh medium capable of continuing the continuous proliferation of embryo-forming callus and embryo. An embryo-forming cell group is separated after 0-500 transplanting operations, the cell group is removed with a proper enzyme mixture and the produced protoplast is separated to obtain a protoplast of a plant of the subfamily pooideae, family Gramineae. The obtained protoplast can be regenerated to a plant body.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-5857

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)1月10日

C 12 N 5/04
A 01 H 4/00
A 01 N 1/02

7804-2B
7215-4H※

審査請求 未請求 請求項の数 56 (全33頁)

⑮ 発明の名称 プロトプラストからブーイデアエ亜科のイネ科植物の再生

⑯ 特 願 平1-55902

⑰ 出 願 平1(1989)3月8日

優先権主張 ⑱ 1988年3月8日 ⑲ 米国(U S) ⑳ 165665

㉑ 発 明 者 マイケル イー. ホー アメリカ合衆国, カリフォルニア 95695, ウッドランド, トラッキー ウエイ 508

㉒ 発 明 者 クリスチヤン ティー, ハームス アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27514, チヤペルヒル, グレイ プラザ トレイル 1412

㉓ 出 願 人 ナバーガイギー アク スイス国 バーゼル市 クリベツクストラーセ 141
チエンゲゼルシャフト

㉔ 代 理 人 弁理士 嶋 優 美 外2名
最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1 発明の名称

プロトプラストからブーイデアエ亜科のイネ科植物の再生

2 特許請求の範囲

- (1) 細胞嚢を再生し、分裂し、そして植物体に再生され得るカルスを形成するプロトプラストを単離することができるブーイデアエ亜科のイネ科植物から誘導された胚形成性細胞培養体。
- (2) 前記の再生される植物体が雄性植物体である請求項1記載の胚形成性細胞培養体。
- (3) 前記ブーイデアエ植物がグラスまたは小穀類である請求項1記載の胚形成性細胞培養体。
- (4) グラスがポア、フェストウカ、コリウム、ブロムス、トリセタム、アグロスチス、フレウム、アルベクルスおよびダクチリスからなる属から選択される請求項5記載の胚形成性細胞培養体。
- (5) 小穀類がアベナ、トリチカム、セカーレお

よびホルデウムからなる属から選択される請求項6記載の胚形成性細胞培養体。

- (6) 植物体に再生され得るブーイデアエ亜科のイネ科植物のプロトプラストまたは植物細胞。
- (7) 前記再生される植物体が雄性植物体である請求項6記載のプロトプラストまたは植物細胞。
- (8) それらのゲノム内に外因性DNAを安定に組み入れた請求項6記載のプロトプラストまたは植物細胞。
- (9) それらのゲノム内に植物内で発現可能な外因性DNAを安定に組み入れた請求項6記載のプロトプラストまたは植物細胞。
- (10) 細胞培養体から誘導された請求項6記載のプロトプラストまたは植物細胞。
- (11) 胚形成性細胞懸濁液から誘導された請求項6記載のプロトプラストまたは植物細胞。
- (12) グラスまたは小穀類から誘導された請求項6記載のプロトプラストまたは植物細胞。
- (13) 小穀類がアベナ、トリチカム、セカーレお

よびホルデウムからなる属から選択される請求項12記載のプロトプラストまたは植物細胞。

- 04 請求項6ないし15のいずれか1項に記載のプロトプラストまたは植物細胞から再生され、そして植物体に再生され得るブーイデアエ属科のイネ科植物から誘導されたカルス。
- 05 前記再生される植物体が総性植物体である請求項14記載のカルス。
- 06 ブーイデアエ植物がグラスまたは小穀類である請求項14記載のカルス。
- 07 小穀類がアベナ、トリタカム、セカールおよびホルデウムからなる属から選択される請求項16記載のカルス。
- 08 請求項6ないし13のいずれか1項に記載のプロトプラストまたは植物細胞から再生され、そして植物体に再生され得るブーイデアエ属科のイネ科植物から誘導された細胞培養体。
- 09 前記再生される植物体が総性植物体である

請求項22ないし25のいずれか1項に記載のブーイデアエ属科のイネ科植物。

- 01 それらのゲノム内に外因性DNAを安定に組み入れたプロトプラストまたは植物細胞からなるブーイデアエ属科のイネ科植物およびそれらのムカゴ。
- 02 安定に組み入れられた外因性DNAが植物または植物細胞内で発現可能である請求項27記載のブーイデアエ属科のイネ科植物およびそれらのムカゴ。
- 03 有性的にまたは無性的に、そして生体内でまたは試験管内で増殖され得る植物材料からなる請求項22ないし28のいずれか1項に記載のムカゴ。
- 04 トランスジェニックブーイデアエ植物から得られたプロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、接合子、胚、花粉または種子からなる請求項22ないし28のいずれか1項に記載のムカゴ。
- 05 請求項22ないし28のいずれか1項に記載の植物の後代。

請求項18記載の細胞培養体。

- 00 ブーイデアエ植物がグラスまたは小穀類である請求項19記載の細胞培養体。
- 01 小穀類がアベナ、トリタカム、セカールおよびホルデウムからなる属から選択される請求項18記載の細胞培養体。
- 02 請求項1ないし5のいずれか1項に記載の胚形成性細胞培養体から再生されたブーイデアエ属科のイネ科植物およびそれらのムカゴ。
- 03 請求項6ないし13のいずれか1項に記載のプロトプラストまたは植物細胞から再生されたブーイデアエ属科のイネ科植物およびそれらのムカゴ。
- 04 請求項14ないし17のいずれか1項に記載のカルスから再生されたブーイデアエ属科のイネ科植物およびそれらのムカゴ。
- 05 請求項18ないし21のいずれか1項に記載の細胞培養体から再生されたブーイデアエ属科のイネ科植物およびそれらのムカゴ。
- 06 前記再生される植物体が総性植物体である

載の植物の後代。

- 02(a) ブーイデアエ植物の適当な部分から組織を単離し、
 - (b) この組織を胚形成性カルスおよび胚の形成を誘導し得る増地中で培養し、
 - (c) 胚形成性カルスおよび胚を連続的増殖を誘導させ得る新鮮培地上で周期的に継代培養し、
 - (d) 0ないし500回の移し換え後に胚形成性細胞群を単離し、そして
 - (e) 適当な培養混合物で細胞群を除去し、そして生成したプロトプラストを単離することからなる、
- 植物体に再生され得るブーイデアエ属科のイネ科植物のプロトプラストを複製する方法。
- 03 ブーイデアエのプロトプラストが総性植物体に再生され得る請求項32記載の方法。
 - 04 段階(a)の組織がブーイデアエ植物の幼内葉の基部、未熟生殖胚、未熟花序、成熟種子または実生組織から単離される請求項32記載

の方法。

39 段階(a)の組織が最も幼若な内葉から単離される請求項34記載の方法。

40 胚形成性細胞群の単離を0ないし100回の移し換え後に行う請求項34記載の方法。

41 胚形成性細胞群の単離を3ないし50回の移し換え後に行う請求項36記載の方法。

42(a) 植物体に再生され得るプロトプラストまたは植物細胞を、それらが細胞コロニーを形成するまで適当な培養培地中で培養し、
(b) 細胞培養体形成を促進するための適当な培地上で前記細胞コロニーまたはそれらの一部を培養し、そして

(c) 生じる細胞培養体を単離することからなる植物体に再生され得るブーイデアエ属科のイネ科植物の細胞培養体を作製する方法。

43(a) 植物体に再生され得るプロトプラストまたは植物細胞を、それらが細胞コロニーを形成するまで培養体形成を促進するために十分な期間、適当な培養培地中で培養し、

44 段階(b)において細胞コロニーの一部が細胞コロニーから遊離された細胞である請求項38または39のいずれかに記載の方法。

45 プロトプラストまたは細胞がそれらのゲノム内に安定に組込まれた外因性DNAを含有する請求項38または39のいずれかに記載の方法。

46 組込まれた外来DNAが植物細胞内で発現可能である請求項46記載の方法。

47(a) プロトプラストから誘導され、そして胚形成を誘導し得る培地上で植物に再生され得るブーイデアエ植物のカルス、胚が形成されるまで培養し、

(b) 胚の成熟および発芽の誘導に適当な培地上で胚を培養し、そして

(c) 得られた小植物体を土に移して成熟植物を形成するには十分に生長するまで該小植物体を培養する、

ことからなるカルスからブーイデアエ属科のイネ植物を再生させる方法。

そして

(d) 生じる細胞培養体を単離することからなる植物体に再生され得る請求項38記載のブーイデアエ属科のイネ科植物の細胞培養体を作製する方法。

48 前記細胞培養体が稈性植物体に再生され得る請求項38または39のいずれかに記載の細胞培養体を作製する方法。

49 細胞培養体が懸濁培養体である請求項38ないし40のいずれか1項に記載の方法。

50 細胞培養体がカルス培養体である請求項38ないし40のいずれか1項に記載の方法。

51 段階(a)が固化剤としてアガロースの存在下で行われる請求項38または39のいずれかに記載の方法。

52 段階(a)のアガロース固化培地の硬化または該培地の切断を行い、液化アガロース培地またはアガロース培地の断片を液体栄養培地に移し、そして細胞コロニーが形成されるまで培養することからなる請求項43記載の方法。

53(a) プロトプラストから誘導され、そして胚形成を誘導し得る培地上で稈性植物に再生され得るブーイデアエ植物のカルスを、胚が形成されるまで培養し、

(b) 胚の成熟および発芽の誘導に適当な培地上で胚を培養し、

(c) 得られた小植物体を土に移して成熟植物を形成するには十分に生長するまで該小植物体を培養し、そして

(d) 開花摘筋または野外受粉で種子を得る、ことからなるカルスからブーイデアエ属科の稈性イネ科植物を再生させる方法。

54 カルスを形成する植物細胞がそれらのゲノム内に安定に組込まれた外因性DNAを含有する請求項38または49のいずれかに記載の方法。

55 組込まれた外因性DNAが植物細胞内で発現可能である請求項50記載の方法。

56(a) 全体の植物体に再生され得るプロトプラストを外因性DNAでこの分野では公知の形

質転換法を用いて形質転換し、

- (h) 請求項38または39のいずれかの記載に従って形質転換されたプロトプラストを培養し、そして
- (c) 請求項48または49のいずれかの記載に従って全体の植物体を再生させることからなるブーイデアエ属科のトランスジェニックイネ科植物を作製する方法。
- 53 前記外因性DNAが、価値ある特性を有する形質転換された植物プロトプラスト、プロトプラスト誘導組織および最終的にプロトプラスト誘導植物体を提供する1型またはそれ以上のキメラ遺伝子からなる請求項52記載の方法。
- 54 前記外因性DNAが、調節機能を示す非コード性DNA配列からなる請求項52記載の方法。
- 55 胚移植遺伝子導入法がプロトプラストの形質転換のために段階(a)で用いられる請求項52記載の方法。
- 56(a) 適当な液体培養増殖中に活発に生長する

懸濁培養細胞またはカルスを分散し、

- (b) この培養液を約0℃ないし5℃まで冷却し、
- (c) ほぼ同じ温度で前記の予め冷却した培養液を適当な凍結保蔵用水溶液と混合し、
- (d) 生成した混合物を毎分約0.01℃ないし約20℃の速度で、約-20℃と約-60℃の間の温度まで冷却し、
- (e) 予め冷却した混合物を液体窒素または液体空気中で衝撃凍結し、そして
- (f) 凍結した混合物を-100℃より低い温度で保存することからなる、
- イネ科植物の懸濁培養体およびカルス培養体を包含する胚形成性細胞培養体を凍結保存する方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はプロトプラストから、もしくは再生された細胞器を有するプロトプラスト（植物細胞）またはプロトプラスト誘導カルスから再生

されるブーイデアエ (*Pooideae*、イネゴシナギ) 属科のイネ科植物、およびこれら植物の再生のための一般的に適用可能な方法に関する。植物に再生され得るプロトプラストの膜を調製する胚形成性細胞培養体（懸濁培養体またはカルス培養体）およびカルスにも関する。さらに、上記胚形成性細胞培養体の作製方法、該胚形成性細胞培養体および胚形成性カルスの凍結保存、および遺伝的に改変されたプロトプラストから再生されたトランスジェニックブーイデアエ植物に関する。

（従来の技術）

人類がその食糧の大部分を依存している植物種のほとんどは、イネ科として一体となって知られている植物の群に関する。イネ科 (*Gramineae*, *Poaceae*) は商業的観点から単子葉植物綱の中で最も重要な科である。イネ科は例えば以下の属科および属を含む。

属 科	属科内の属
バンブソイデアエ (<i>Bambusoideae</i>)	バンブー (<i>Bamboo</i>)
アンドロポゴノイデアエ (<i>Andropogonoideae</i>)	サッカラム (<i>Saccharum</i>) [スイートコーン] ソルガム (<i>Sorghum</i>) ゼア (<i>Zea</i>) (トウモロコシ)
アルンジネアエ (<i>Arundineae</i>)	フラグミテス (<i>Phragmites</i>)
オリゾイデアエ (<i>Oryzoideae</i>)	オリザ (<i>Oryza</i>) (イネ)
パニコイデアエ (<i>Panicoideae</i>)	パニカム (<i>Panicum</i>) (*) ペンニセタム (<i>Pennisetum</i>) (*) セタリア (<i>Setaria</i>) (*)
ブーイデアエ [フェストワシアデアエ (<i>Festucaceae</i>)]	ポア (<i>Poa</i>) (**) フェストッカ (<i>Festuca</i>) (**) コリウム (<i>Lolium</i>) (**) ブロムス (<i>Bromus</i>) (**) トリセタム (<i>Trisetum</i>) (**)

アグロステス(Agrostis)(**)
 プレウム(Phleum)(**)
 ダクテリス(Dactylis)(**)
 アロペクルス(Alopecurus)
 (**)
 アベナ(Avena)(オート麦)(*)
 トリチカム(Triticum)(小麦)(*)
 セカレ(Secale)(ライ麦)(*)
 ホルデウム(Hordeum)(大麦)(*)

* ミリット(millet)

** グラス(grasses)

へ 小穀類(small grain cereals)

イネ科の五穀の中でブーイデアエ属科が例えばグラスと小穀類からなる2つの亜群に属したサブグループを包含する経済的に非常に重要な植物の群である。

かもしれないことに、これらのブーイデアエ植物はまた科学的に操作することが最も難しいものだった。培養されたプロトプラストからの植

らの研究において使用された系列からは可能でなかった。

今までイネ科植物はブーイデアエ属科以外のもののプロトプラストからの再生が成功したにすぎず、例えばAbdullah等(1986)は不定胚形成を介してイネ(属科:オリゾイデアエ)プロトプラストから効率の良い植物再生を報告している。Yamada等(1986)もまたプロトプラスト誘導カルスからのイネ植物再生を記載している。また、Rhodes等(1988)はトウモロコシの非線維植物の再生を記載している。Cocking and Davey(1987)は穀類における遺伝子導入におけるこの分野の現状を論じている。

組織培養体からのブーイデアエ属科のイネ科植物の再生は公知である。Hanning等(1982)はカモガヤ(*Dactylis glomerata* L.)の葉片誘導カルスからの胚および小植物体形成を記載している。

培養細胞からのブーイデアエ植物の再生のいくつかのその他の例は以下の文献に報告されて

物再生は体細胞ハイブリッド形成の適用および直接遺伝子導入を介するトランスジェニック植物の作製に必須であるけれども、一般に適用可能な方法はブーイデアエ植物もしくは雑性ブーイデアエ植物の再生、またはプロトプラストからの安定に導入された外因性DNAを含有するブーイデアエ植物には今まで知られていない。穀類内への遺伝子導入における分野の現状はCocking and Davey(1987)により最近報告された。

穀類培養体の源、プロトプラスト、穀類プロトプラストの単離およびそれらの特性は例えば以下の本で報告されている:「穀類組織および細胞培養」('Cereal Tissue and Cell Culture') Bright, B. W. J. and Jones, M. G. K. (1985) Nijhoff, M. Junk, W. Dordrecht)。

適当な形質転換はプロトプラスト内へのDNAの化学的および電気的に刺激された取込みによりイネ科植物において既に達成されている(「胚盤遺伝子導入」)(Potrykus等, 1985; Loez等, 1985; Fromm等, 1986)が、しかし植物再生はこれ

いる:

ロリウム リジダム(*Lolium rigidum*): Skene 等, 1983

ロリウム ベレンネ(*Lolium perenne*), ネズミムギ(*Lolium multiflorum*): Ahloowalia, 1975
 ネズミムギ, フェスツカ アルンジナセア

(*Festuca arundinacea*): Kasperbauer 等, 1979

アロペキュラス アルンジナセウス(*Alopecurus arundinaceus*), アグロパイロン クリスタム(*Agropyron cristatum*), ステパ ビリジュラ(*Stipa viridula*), ブロムス イネルミス(*Bromus inermis*), アグロパイロン ミッチャー(*Agropyron smithii*): Lo 等, 1980
 アグロステス パルストリス(*Agrostis palustris*): Kranz 等, 1982)

牧草の組織培養の状況はまたAhloowalia(1984)により報告されている。

(発明が解決しようとする課題)

しかしながら、これらのブーイデアエ植物はこれらの場合において本発明明細書に記載され

た出発材料のタイプから再生されず、細胞培養体のその他のタイプから再生された。再生が不定胚形成を介して新たに起こったことは、上記の例には示されていなかった。上で引用した参考文献はプロトプラストの単離および培養またはプロトプラストから植物の再生を含んでいなかった。

ブーイデアエ亜科にあるイネ科植物の遺传的形質転換および再生には大きな関心があったけれども、再生され、所望により形質転換されるプロトプラスト誘導植物または総性植物に導き得る成功した試験管内法の記載は今日まで無かった(Cocking and Davey, 1987)。

今までこの方向に向けられた全ての研究およびあらゆる努力は失敗したが、これは早い段階に死滅し、そしてそれ故に成功前に止むことができなかった胚またはせいぜい生育できない小植物体を生じたものである(Ahloowalia, 1984)。

植物体そして好ましくは全体の雄雄植物体に

なカルスおよび胚嚢体、胚並びにそれらを作製および同定する方法は記載されるであろうし、そしてそれも本発明の一部とみなされる。

これらの胚形成性培養体は外因性DNAで形質転換され得るプロトプラストの源であり、そして次いで分裂し、そして土で生長し得る全体の総性植物を包含する全体の植物に再生され得るカルスを形成し得るプロトプラストの源である。

ブーイデアエ亜科のイネ科植物、特に総性イネ科植物がプロトプラストから、プロトプラスト誘導細胞またはプロトプラスト誘導カルスから再生され得ることは、本発明がなされた時点で従来技術から予測できなかった。

それらのゲノム内に外因性DNAを安定に組み入れられて含有するブーイデアエのプロトプラストまたはトランスジェニック植物、特に総性トランスジェニック植物に再生され得ることはなおさら予測できなかった。

本発明はそれ故にまず第一に、プロトプラ

分化し得るブーイデアエのプロトプラストを作製し得る記載はなく、プロトプラストまたはプロトプラスト誘導カルスからブーイデアエ植物の再生の記載はなおさらなかった。

(課題を解決するための手段)

細胞およびカルスコロニーを形成できるプロトプラストを作製する方法を提供する本発明に従って、その他の目的に関するそれらが達成された。プロトプラストは所望により形質転換され得、そして生成するカルスはブーイデアエ植物に再生され得る。分裂し、そしてカルスを形成し得、次いで植物に再生され得るプロトプラストを作製する方法は、出発材料として新設な胚形成性細胞培養体(胚嚢培養体またはカルス培養体)または胚を必要とする。そのような胚形成性細胞培養体、胚並びにそれらを作製および同定する方法は記載されるであろうし、そしてそれは本発明の一部とみなされる。胚嚢体が誘導される胚形成性カルスはまたプロトプラスト用の出発材料として使用され得る。そのよう

トが単離され得るブーイデアエ亜科のイネ科植物から誘導された胚形成性細胞培養体(胚嚢培養体またはカルス培養体)に関し、このプロトプラストは細胞壁を再生し、分裂し、そして総性植物を含む植物に再生され得るカルスを形成する。

本発明はまた、好ましくは総性である植物に再生され得るブーイデアエのプロトプラストおよびそれから生じる植物細胞(細胞壁再生の後)にも関し、好ましくは細胞培養体から、または胚形成性細胞胚嚢体から誘導されたプロトプラストに関する。

本発明はまた、前記プロトプラストから誘導された植物細胞、カルス、胚形成性細胞胚嚢体、胚、小植物体および植物にも関する。

さらに本発明は再生されたブーイデアエ植物およびそれらのムカゴ(propagule)、特にそれらのゲノム内に安定に組み入れられた植物内で発現可能な外因性DNAを含有するプロトプラストまたは植物細胞から誘導された上記のものに關

する。ムカゴは有性もしくは無性に増殖されるか、または生体内もしくは試験管内で増殖されるあらゆる植物材料を包含する。この材料の中で、トランスジュニク プーイデアエ植物から得られたプロトプラスト、組織、カルス、組織、器官、接合子、胚、花粉または種子が好ましい。プーイデアエ植物の突然変異体および変種を包含し、体細胞融合から得られた植物の突然変異体および変種を包含する前記植物の後代 (progeny)、遺伝子改変体または突然変異体選択はさらに本発明の目的である。

本発明はまた、植物、特に接性植物に再生されるプーイデアエのプロトプラストおよびプーイデアエ植物細胞を複製する方法、前記プロトプラストまたは植物細胞から誘導され、そして植物、好ましくは接性植物に再生されるプーイデアエのカルスを複製する方法に関する。さらに、これらのカルスからプーイデアエ植物の再生方法に関する。これらの方法を以下に詳しく記載する。

の細胞からなる識別できる形態、構造および細胞器官の段階にあるもの (トリモロコシの胚生長は例えば Dandolph (1936) に記載され、グラメの胚生長は例えば Brown (1960) に記載されている)。

細胞群：互いに結合した連結細胞の群；細胞分裂により先祖細胞またはプロトプラストから通常誘導される。

小植物体：小さい植物の形態にある芽条と根からなる多細胞構造体。

ジカムバ (Dicamba)：3, 6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸。

MES：2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸。

2, 4-D：2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸。

ピクロラム (Picloram)：4-アミノ-3, 6, 6-トリクロロピコリン酸。

トリメ塩酸：アルファ、アルファ、アルファ-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン塩

本発明のこれらの目的およびその他の目的は以下の詳細な記載から明らかになるであろう。

定義

発明の詳細な説明および特許請求の範囲の明確なそして首尾一貫した理解を提供するために、そのような用語に与えられた範囲を含めて、以下に定義を与える：

植物細胞：プロトプラストおよび細胞壁からなる植物の構造的および生理学的単位。

植物組織：構造および機能的単位内に組織化された植物細胞の群。

植物器官：明確で可視の分化した植物の部分、例えば根、茎、葉、花、芽または胚。

プロトプラスト：細胞壁のない単離された植物細胞。

細胞培養体：未分化または部分的に分化した状態にある細胞の増殖集合体。

胚：接合体(生殖胚)または不定胚形成細胞(体細胞胚)のいずれかから誘導される植物の微小な早期の生長段階で、球形ないし子葉段階

段。

EDTA：1-エチレンジアミン N, N, N', N'-四酢酸。

PEG：ポリエチレングリコール

アガロース：アガロースの調製および精製は、例えばガイスレーおよびレン (Gulsecley and Rena), ('The Agarose Monograph', Marine Colloids Division FMC Corp. (1975年)) に記載されている。

アガロースは寒天の成分の1つである。市販されて利用できる寒天は通常、多数の側鎖を有する中性アガロースおよびイオン性アグロペクテンの混合物からなる。市販のアガロースは通常、慣用の方袋で寒天から得られる。通常かなりの側鎖はそのまま残り、アガロースの物理化学的性質、例えばゲル形成温度および融点を決定する。低融点アガロース、特にシープラーク (Seaplaque)® アガロースは、後記する方法での好ましい固化剤である。

SH-0 培地：ホルモンを含まない Schenk および Hildebrandt (1972) の培地。

(SH)培地は液状であるかまたは0.8% (w/v) 寒天もしくは0.5% (w/v) 登録商標グルライト (Gel-lite)®で固化され得る。培地は当該分野で公知の方法で例えば約15ないし20分間、121℃および圧力151 lb/in²でオートクレーブすることによる加熱または殺菌により通常殺菌される。

グルライト：ロードアイランド州、フィスカースヴィレにあるスコット ラボラトリー社 (Scott Laboratories Inc.) のグルライト グラン ガム (Gel-lite Gellan Gum)。

SH-30 培地：30 μM シカムバを含有するSH-0 培地。

SH-45 培地：45 μM シカムバを含有するSH-0 培地。

KM-80 培地：Kao (1975) の培地 Bp

この培地は液状であっても、または寒天、アガロースもしくはグルライトで固化されても良く、そして同様にアスコルビン酸、ビタミンDおよびビタミンAなしで調製および使用しても

良い。固化剤を除く培地成分は通常0.2 μm フィルターを通す手段により滅菌される。

KY-2 培地：Yamada 等 (1986) の培地。

OMS 培地：Murashige および Skoog (1962) の培地。

この培地は例えば0.8% (w/v) 寒天もしくはアガロースまたは0.5% (w/v) グルライトで固化され得る。本明細書に記載した方法のために、この培地はガムボルク等 (1968) のB5培地のビタミン組成を含有するように調製しても良い。

セルラーゼ B3：東京都港区東新橋1-1-19にあるヤクルト本社 (株) 製のセルラーゼ B3。

登録商標ペクトリアーゼ Y-23 (Pectolyase Y-23)®：東京都日本橋小網町4-13にあるセイシン (Seishin) 薬品 (株) 製。

登録商標パラフィルム (Parafilm®)：米国、コネチカット州、グリーンウィッチにあるアメリカン カン社 (American Can Co.) 製のパラフィルム ラボラトリイフィルム。

登録商標ナルゲンフィルター (Nalgen® filter)：米国、ニューヨーク、ロチェスターにあるシブロン社 (Sybron Corp.) の小会社のナルゲ社 (Nalge Co.) 製。

Bgl II：制限酵素 Bgl II：米国、マサチューセッツ州、ビバリー、トーザーロード32にあるニューイングランドバイオラプス (New England Biolabs) 製またはその他。

Bam HI：制限酵素 Bam HI：上記ニューイングランドバイオラプス製またはその他。

カゼイン水解物：米国、ミズーリ州、セントルイスにあるシグマ社 (Sigma Co.) 製のカゼイン水解物 (牛乳1型からの酵素的水解物)。

ハイグロマイシン B：サイトトキシン：精製ハイグロマイシン B；米国、カリフォルニア州、ラジョラにあるカルビオケム ベーリング ダイアグノスチカ (Calbiochem Behring Diagnostics) 製のカタログ番号400050、ロット番号702290。

登録商標ジーンスクリーンプラス (Gene Sc-

reen Plus®)：米国、マサチューセッツ州、ボストン、アルバニーストリート549にあるニューリサーチプロダクツ (NEW Meserch Products) 製のカタログ番号NEP976。

TBS緩衝液：トリス調整緩衝液、電気泳動用の慣用緩衝液、Maniatis 等 (1982) 参照。

スビンカラム：米国、ニュージャージー州、ピカタウエイにあるベーリンガー マンハイム バイオケミカルズ (Boehringer Mannheim Biochemicals) 製のカタログ番号108402のセファデックス G25の予備充填カラム。

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム。

SSC：Maniatis 等 (1982) に記載されたような154 mM NaCl, 0.154 M クエン酸ナトリウム。

CETAB：ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド。

INHランダムプライマーキット：米国、コネチカット州、ニューヘブレンにあるインターナショナル バイオテクノロジ社 (Inter-National

Biotechnologies Inc.)製の「プライマー タイム」ランダムキット(カタログ番号77800;ロット番号F630-01)。

ブーイデアエ属科のイネ科植物がプロトプラストの特定の型、およびこれらのプロトプラストから誘導された細胞またはカルスから再生され得ることが驚くべきことに今見い出された。

稈性植物を包含する植物のこの再生はまた、このプロトプラストが外因性DNA、好ましくは植物ゲノム内に安定に組入れられ、そして植物内で発現され得る外因性DNAを含有する場合も可能である。

ブーイデアエ属科のあらゆるイネ科植物が本発明において使用され得る。しかしながら、好ましくはブーイデアエ植物はタラス例えばポア、フェストリカ、ロリウム、プロムス、トリセラム、アグロステス、フレナム、アロペクルムおよびダクナリスからなる群から選択されるおのの属に属するものである。ダクナリス属のものが最も好ましい。また、ブーイデアエ植物、

で小穀類に属するものも好ましく、例えばブエナ(オート麦)、トリチカム(小麦)、セカレ(ライ麦)およびホルデウム(大麦)からなる群から選択されるおのの属のものである。

分裂し、そして植物に再生され得る細胞培養体を形成するブーイデアエのプロトプラストの特定の型は、細胞培養体、好ましくは胚形成性細胞培養体に由来する。胚形成性細胞培養体は好ましくは胚形成性懸濁液または胚形成性カルス培養体である。細胞培養体はブーイデアエ植物の適当な部分から誘導されても良い。植物の適当な部分はブーイデアエ植物の幼葉の基部、成熟生胚、未熟花序、成熟種子または葉組織を包含するが、これに限定されない。

段階A: 植物組織から胚形成性懸濁液の調製

胚形成カルスはブーイデアエ植物の適当な部分、典型的にはブーイデアエ植物の幼葉の基部、最も好ましくはより幼若な内葉の基部から開始される。これはHanning等(1982)によりカモガヤに対して記載されたように行われるが、し

かしその他の全てのブーイデアエ植物に対しても利用できる。この種植物を参照により本明細書内に記入する。

葉を例えば約1mmないし5mmの長さまたは直径の小切片または断片に切る。これらの片の形および大きさは重要でない。これらの断片を、適当なカルス誘導および維持培養上に置き、そしてカルスおよび/または胚形成性懸濁液ができるまで培養する。適当な培地は例えば50μMジカムバおよびグル化剤として0.8% (w/v) 寒天またはアガロースを含有するSH培地[SchenkおよびHildebrandt, 1972]である。その他の適当な培地中にはGeorge等(1987)に記載されたものがある。プレーティング後2ないし6週間以内にカルスおよび/または胚形成性懸濁液が通常現われる。カルスの開始および維持は明所で、または好ましくは暗所で、そして0℃と50℃、好ましくは20℃と32℃、最も好ましくは25℃と28℃の間の温度で行っても良い。胚形成性カルスはまたこの分野で公

知のその他の方法、例えばLührsおよびLörz(1987)およびその中の文献により記載された大麦に対する方法により調製されても良い。これらの方法はその他のブーイデアエに用いることができ、そして参照により本明細書内に記入される。

胚形成性懸濁液培養体は胚形成性カルスの新鮮切片を適当な液体培地中に置くことにより、例えば45μMジカムバおよび4g/lカゼイン水解物を含有するGray等(1985)に記載された液体培地50ml中にカルス0.5gを置くことにより開始される。その他の適当な培地の中で、George等(1987)に記載のものがある。懸濁培養体を10℃と40℃、好ましくは20℃と32℃、最も好ましくは25℃と30℃の間の温度で生長させる。培養期間の間の明と暗の選択は有利であり得る。懸濁液を好ましくは、5ないし20時間、好ましくは16時間の明期間、続いて5ないし20時間、好ましくは8時間の暗期間で生長させる。光強度は典型的には0.1

$\mu\text{B}/\text{m}^2\text{s}$ と $100\mu\text{B}/\text{m}^2\text{s}$ (B = フィンジュアイン ; m = メートル ; s = 秒)、好ましくは $30\mu\text{B}/\text{m}^2\text{s}$ と $80\mu\text{B}/\text{m}^2\text{s}$ の間である。培養期間の間の懸濁体の振とうも有利である。振とうは例えば、回転振とう機上約 100rpm ないし 150rpm で、光透過性のプラスチックフィルムおよび綿袋またはその他の適当な栓で密閉したデロングフラスコ中で行われる。約3ないし5週後、より大きい細胞塊を約30秒間静置して、そして小さい細胞群のみを含有する上清培養地を除き、そして新鮮培養地に移して新しい培養を開始させる。

この操作は周期的に、好ましくは3ないし4週毎に、より小さい群の大きさおよび数により判断される最も成功する培養体を用いて繰返され得る。4ないし20回、通常6ないし8回の移し換えの後、懸濁体は胚形成性でない細胞を実質的に含まず、そして胚形成性細胞群の大部分が典型的には約 $150\mu\text{m}$ ないし $2000\mu\text{m}$ の大きさである。

本発明のその他の好ましい実施態様は小穀類、特にアベナ、トリチカム、セカーレおよびホルデウムからなる属から選択されるものから誘導される胚形成性細胞培養体(懸濁培養体およびカルス培養体)からなる。

本発明のその他の目的は、プロトプラストが単離され得るブーイデアエ亜科のイネ科植物から誘導された胚形成性カルスであり、前記プロトプラストは細胞壁を再生し、分裂し、そして植物および好ましくは緑性植物体に再生され得るカルスを形成する。

グラス、特にポア、フェストッカ、コリウム、プロムス、トリセタム、アグロスチス、フレウム、アロベクルスおよびダクナリスからなる属から選択されるものから誘導される胚形成性カルスが本発明の好ましい実施態様である。カモガヤの胚形成性カルスが最も好ましい。

本発明のその他の好ましい実施態様は小穀類、特にアベナ、トリチカム、セカーレおよびホルデウムからなる属から選択されるものから誘導

される胚形成性懸濁体を得るための方法において、懸濁体は小さい胚形成性塊から生として得られることが好ましい。より大きい材料を静置した後、懸濁体の上部だけを懸代培養することにより、胚形成性塊の比率を顕著に高めることも可能である。

従って本発明の1つの目的は、プロトプラストが単離され得るブーイデアエ亜科のイネ科植物から誘導された胚形成性細胞培養体、懸濁培養体またはカルス培養体であり、前記プロトプラストは細胞壁を再生し、分裂し、そして植物および好ましくは緑性植物体に再生され得るカルスを形成する。

グラス、特にポア、フェストッカ、コリウム、プロムス、トリセタム、アグロスチス、フレウム、アロベクルスおよびダクナリスからなる属から選択されるものから誘導される胚形成性細胞培養体(懸濁培養体およびカルス培養体)が本発明の好ましい実施態様である。カモガヤの胚形成性懸濁体が最も好ましい。

される胚形成性カルスからなる。

本発明のその他の目的は、前記胚形成性細胞培養体から誘導され、プロトプラストまたは植物細胞から再生されるブーイデアエ亜科のイネ科植物、好ましくは緑性イネ科植物およびそれらのムカゴである。

全てのイネ科植物の細胞培養体(懸濁培養体およびカルス培養体)の凍結保存方法

いくつかの植物組織は、例えば Withers (1986) およびその中に引用された文献に記載されたこの分野で公知の方法により凍結保存され得る。しかしながら、これらの方法は一般的に適用可能ではなく、特にイネ科植物の胚形成性細胞培養体(懸濁培養体およびカルス培養体)の凍結保存に適用できない。全てのイネ科植物の懸濁培養体およびカルス培養体を包含する胚形成性細胞培養体は低温での凍結保存により懸濁状態で保存され得ることが、本発明の範囲内で驚くべきことに今見いだされた。

イネ科植物の懸濁培養体およびカルス培養体

を包含する胚形成性細胞培養体を凍結保存することの方法は、

- (a) 適当な液体培養培地中に活発に生長する懸濁培養細胞またはカルスを分散し、
- (b) この培養液を氷点（約0℃ないし5℃）まで冷却し、
- (c) ほぼ同じ温度で前記の予め冷却した培養液を適当な凍結保護用水溶液と混合し、
- (d) 生成した混合物を毎分約0.01℃ないし約20℃の速度で、好ましくは毎分約0.1℃ないし約5℃の速度で、より好ましくは毎分約0.2℃ないし約2℃の速度で、最も好ましくは毎分約0.5℃ないし約1℃の速度で、約-20℃と約-60℃の間、好ましくは約-35℃と約-50℃の間、非常に好ましくは約-30℃と約-44℃の間の温度まで冷却し、
- (e) 予め冷却した混合物を液体窒素または液体窒素中で衝撃凍結し（shock freezing）、そして
- (f) 凍結した混合物を-100℃より低い温度、

本方法は典型的には以下のように行われる：活発に生長するカルスまたは懸濁培養細胞（通常、離代培養して1ないし40日後、好ましくは2ないし10日後）の適当量を適当な液体培地中に分散させる。そのような適当な培地はSH-0、SH-30もしくはSH-45培地、OM3、KM-0p、HY-2、マンニトール、ショ糖もしくはその他の糖または糖アルコール溶液、アミノ酸（例えばL-プロリン）の溶液または水をも包含するが、これに限定されない。細胞の生長に適当な培地、または糖もしくは糖アルコールの水溶液が好ましい。典型的にはカルス0.01gないし0.1gを液体培地1ml当たり分散させ、そして次に氷上で冷却する。

適当な凍結保護溶液は典型的には水中の浸透圧的に活性な成分およびDM90の混合物である。それらを段階(b)の予め冷却した分散液に添加する時、それらを通常氷上で予め冷却するが、しかしおよそ室温までのより高い温度であっても良い。凍結保護用溶液の温度は重要でない。

好ましくは液体窒素または液体窒素の温度で貯蔵する、ことからなる。

胚形成性細胞培養体（懸濁培養体およびカルス培養体）の凍結保存のこの方法は、全ての植物に一般に適用可能である。これに関して「イネ科植物」という用語は、パンブソイデアエ（例えばタケ）、アンドロゴゴニデアエ（例えばサッカラム、ソルガム、およびゼア）、アルンジネアエ（例えばフラグミテス）、オリゾイデアエ（例えばオリザ）、パニソイデアエ（例えばパニカム、ペンニセタムおよびセタリア）およびブーイデアエ（例えばポア、フェストウカ、ロリウム、ブロムス、トリセタム、アグロステス、フレウム、ダクチリスおよびアロペクルスを包含するグラス、またはアベナ、トリチカム、セカーレおよびホルデウムを包含する小穀類）を包含するが、これに限定されない。

イネ科植物内の好ましい限定的群はグラスと小穀類とからなるブーイデアエ植物の上記の特徴づけられた群である。

代表的な凍結保護溶液は0.5Mないし2Mグリセロール、0.5Mないし2M L-プロリン、0.5Mないし4Mジメチルスルホキシド(DMSO)からなるpH5.6の水溶液または0.3Mないし2Mグリセロール、0.5Mないし2Mショ糖および0.5Mないし4M DMSOからなるpH5ないし7の水溶液を包含するが、限定されない。凍結保護溶液用のその他の適当な成分は糖および糖アルコール、アミノ酸、およびポリマー例えばPEGを包含する。DMSOを含有する凍結保護溶液は使用前に新たに調製することが好ましいが、また凍結貯蔵されても良い。その他の凍結保護溶液は使用前に調製しても良いが、しかし好ましくは新たに調製するか凍結しておく。

凍結保護溶液は典型的に分散された懸濁培養細胞またはカルスを含有する溶液に1秒ないし4週間、好ましくは1秒ないし1日、より好ましくは1秒ないし1時間かけて添加される。氷上に適当な期間、好ましくは1分ないし2日、より好ましくは10分ないし6時間、非常に好

ましくは30分ないし2時間、細胞を凍結保護液に露す。この時間の間または後に小部分を、殺菌した凍結保存用バイアルまたはあらゆるその他の適当な容器に分取し、そして通常氷上に保つ。

上記の小部分の添加に先だつてバイアルを好ましくは0℃と4℃の間の温度である液体浴の表面に浸ける。この浸漬段階は絶対に必要であるわけでないが、ある場合には有利であり得る。この浴はエタノールまたはその他のあらゆる適当な冷媒から構成されても良い。浴は通常冷媒を混合した状態に保つために攪拌装置を備えており、制御された速度で冷媒の循環を可能にする装置に連動されている。

バイアルを冷媒内にいったん入れたら、温度を適当な速度で下げる。適当な速度は、毎分約0.01℃ないし約20℃の速度、好ましくは毎分約0.1℃ないし約5℃の速度、より好ましくは毎分約0.2℃ないし約2℃の速度、最も好ましくは毎分約0.5℃ないし約1℃の速度である。

ましくは35℃ないし40℃の浴液中激しく攪拌しながら、全ての氷が融けるまで融解させる。ブーディアエ亜科の凍結保存された細胞のバイアルは、全ての氷が融解するまで室温で空気中にそれを放置することにより融解させ得ることが本発明の範囲内で驚くべきことに見出された。バイアルを次に数秒ないし60分間、より好ましくは1ないし10分間、その中に含まれるカルス材料を適当な培地上に移す前に氷上に保持しても良い。

バイアルの内容物を適当な圃化培養培地上に拡げる。典型的には融解培養液0.5mlを培地30mlないし50ml含有の各々直径10cmのペトリ皿上に拡げる。凍結保護液を細胞から分離させて排出するために固体培地は傾斜をつけて注がれても良いし、また穴をまわりに通つても良い。細胞を液体培養培地またはその他の適当な溶液で、例えば糖もしくは糖アルコール、またはアミノ酸溶液で1回または数回、適当な培養培地に移す前に洗浄しても良い。

温度が低温、典型的には約-20℃と約-60℃の間、好ましくは約-35℃と約-50℃の間、非常に好ましくは約-38℃と約-44℃の間の温度まで達した時に、バイアルを例えば液体窒素または液体空気中に落とすことにより衝撃凍結させる。それらを液体窒素または液体空気中に落とす最適温度は、使用した異なる培養体により変わるが、しかし一般には-20℃と-50℃の間であり、そして当業者により容易に決定され得る。バイアルを次に液体窒素または液体空気中、その液体自体の中かまたはその蒸気中に、-100℃を越えない温度で貯蔵する。

いくつかの培養体に関して、最適温度に達したとき液体窒素中にすぐに落とす代わりにある期間ある安定な低温にバイアルの温度を保持することは望ましいかも知れない。

生存可能な細胞培養体を回収するために、カルス材料を含有するバイアルを液体窒素から取り出す。バイアルを約10℃ないし50℃、好

ベトリ皿を上で胚形成性カルスに記載したように27℃暗所で培養する。次いで、上記の通常の胚形成性カルスに対するようにカルスを継代培養する。

段階B: 結性植物を包含する植物に再生される得るプロトプラストの単離および精製

上記段階Aから得た胚形成性懸濁液からプロトプラストを精製する。懸濁培養培地から胚形成性細胞群を単離し、例えばナルゲン0.2μmフィルターで段階Aの懸濁培養液をろ過し、そして生成した細胞群を、プロトプラストを傷つけないで細胞壁を除去し得る適当な酵素調剤と培養することにより、単離および精製を行う。酵素はフィルター滅菌したものを用いる。全ての培養操作は滅菌材料を用いて滅菌条件下で行う。適当な酵素調剤は、例えば7mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.7mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3mM MES (pH 5-7) およびブドウ糖(550mOsm/kg H_2O に対して)中の約2% (w/v) のセルラーゼR3からなっている。通常混合物を非暗い光(約5μE/

m²s) の中間板と上板と、約 50 rpm でゆっくり回りとさせるが、これは必要ではない。プロトプラストが遊離されるまで 0℃ と 50℃、好ましくは 10℃ と 35℃、最も好ましくは 26℃ と 32℃ の間で消化を続ける。消化に要する時間は典型的には数秒と 2 日、好ましくは 1 時間と 1 日、最も好ましくは 3 と 5 時間の間である。

遊離されたプロトプラストを濾過紙、例えば戸過、遠心分離および洗浄により集めそして洗う。

この段階で浮上段階を含めても良い。この場合洗浄したプロトプラストを適当な培地、例えばシヨ糖で 700 mOs/Kg H₂O とした KN-8p 培地、またはもちろん Gerge 等 (1987) に記載されたその他の適当な培地の上に接種する。

約 60 秒で約 10 分間遠心分離した後、界面に落着いたプロトプラストを集める。最後にプロトプラストを同じ培養培地中に再懸濁し、通過を、例えばステンレス鋼メッシュスクリー

ン (メッシュサイズ 20 μm) にそれらを通することにより行うことができる。

シヨ糖上に浮上しなかったプロトプラスト調製物の全未消化細胞の混入は、全体の約 0.001 ないし 0.01 % である。シヨ糖浮上段階で包含される細胞混入は最盛である。しかしながら、シヨ糖浮上段階は最も薄い細胞層を有するプロトプラストの重大な損失を生じる。結果的に、浮上段階が包含される場合、プレート効率 (plating efficiency) は 10 倍まで低下し得る。プロトプラストはまたその他の公知方法、例えばシヨ糖溶液上への浮上、またはその他の適当な緩衝性高密度媒体、例えば発酵糖はパーコール (Percoll®) を用いて精製することもできる。

プロトプラスト収率および次のプレート効率 (plating efficiency) は、プロトプラスト単離に用いた懸濁培養液を予め 1 ないし 30 日、好ましくは 5 ないし 10 日無代培養する場合に最速である。

上で製法づけられた酵素混合物は Lu 等 (1981)

に記載されたものの変形であり、そして試験されたその他の混合物より優れていることがわかり、新鮮重量 1 g 当たり 40 × 10⁶ ないし 70 × 10⁶ 個プロトプラストの収率を与える。また、しかしながら、KN-8p 培地またはその他の適当な培地、例えば George 等 (1987) に記載のものの中の 2% (w/v) セルラーゼ RS もまたプロトプラストのかなり良好な収率を与える。収率および次のプレート効率に関してプロトプラストはシヨ糖より明らかに優れ、そしてプロトプラストの単離の間に用いられる浸透圧保持剤としてのマンニトールよりいく分優れている。この分野で公知のその他の適当な酵素混合物が本発明の方法で使用されても良い。

篩過、例えば 20 μm スクリーンを通過させた後に得られたプロトプラストは平均で直径 12 μm ないし 15 μm であり、そして通常は細胞壁を有する。

従って、本発明は植物、好ましくは陸性植物に再生され得るブーイデアエ亜科のイネ科植物のプロトプラストの作製方法を提供する。この方法は：

(a) ブーイデアエ亜科のイネ科植物の適当な部分、好ましくは幼内葉の基部、未熟生殖胚、未熟花序、成熟種子または葉組織、最も好ましくは最も幼若な内葉を単離し、

(b) この組織を胚形成性カルスおよび胚の形成を誘導し得る培地中で培養し、

(c) 胚形成性カルスおよび胚を連続的増殖を維持させ得る新鮮培地上で周期的に継代培養し、

(d) 0 ないし 500 回、好ましくは 0 ないし 100 回、最も好ましくは 6 ないし 8 回の移し換え後に胚形成性細胞群を単離し、そして

(e) 適当な酵素混合物で細胞壁を除去し、そして生成したプロトプラストを単離および精製する、ことからなる。

本発明のその他の実施態様は、植物、特に陸性植物に再生され得るブーイデアエ亜科のイネ

科植物のプロトプラスト(細胞壁再生後の植物細胞を含む)を含む。細胞培養体または胚形成性細胞懸濁体のいずれかから誘導されたプロトプラストまたは細胞が好ましい。

前記プロトプラストまたは植物細胞から再生されたブーイデアエ属のイネ科植物、特に粘性イネ科植物およびそれらのムカゴもまた含まれる。

段階C: 植物および粘性植物に再生し得るプロトプラスト培養体の確立およびカルスの発生

上記段階Bの精製プロトプラストを外因性DNAと処理するか、またはせずに適当な液体または固化培地中にプレーティングする(外因性DNAとの処理は次のベラグラフに詳しく記載するであろう)。いくつかの適当な培地は適当な濃度の寒天および植物生長調節剤を含むKM-8p; NY-2 (Potrykus 等, 1979); および SH-30 および SH-45 に基づいたものを包含する。好ましい固化剤は寒天、特にシーブランクアガロ

ース[米国、マイン州、ロックランドにある FMC 社、マリノコロイズディビジョン(Marine Colloids Division)]である。使用する場合、シーブランクアガロースの濃度は0.1%と2.5%、好ましくは0.6%と1.5%(w/v)の間である。

アガロース含有培地上でのプロトプラストのプレーティングは Shillito 等(1985)、欧州特許出願 EP-0129600 (Shillito 等)、または Adams 等(1983)に記載の方法に従って行うことができる。これらの刊行物は参照により本明細書内に導入する。

プロトプラストを培養する培地はプロトプラストが分裂し、そしてコロニーを形成することを支持する適当な物質を含有し得る。これらの物質は、例えば 2,4-D、ジカムバ、ピクロラム、またはその他の植物生長調節剤を包含する。適当な植物生長調節剤はこの分野で公知である。そのような物質の濃度は通常 0.01mg/L ないし 100mg/L の範囲である。

サリチル酸およびその誘導体は、ブーイデア

エのプロトプラストの分裂および/または該プロトプラストからコロニー形成を促進し得る。サリチル酸の誘導体はO-アシルおよびO-アリール誘導体を包含するが、これに限定されない。O-アシル誘導体は短鎖アシル基、例えば炭素原子数1ないし7、好ましくは1ないし4、そして最も好ましくは2もしくは3を有するものを含むが、これに限定されない。O-アリール誘導体は融合していても良くても良い1個またはそれ以上の5または6員環を有するものを含むが、これに限定されない。この環は非置換または炭素原子数1ないし5のアルキル基、炭素原子数1ないし4のO-アルキル基、ハロゲン原子(特に塩素原子および臭素原子)、ニトロ基、アミノ基および炭素原子数1ないし4のアルキル基により置換されたアミノ基を含む基1個またはそれ以上により置換されても良い。

サリチル酸の誘導体はまたカルボン酸エステルをも含む。好ましいカルボン酸エステルはアリールおよび炭素原子数1ないし4のアルキル

基を有するアルキルエステルである。

さらに、サリチル酸の誘導体はサリチル酸環が例えば炭素原子数1ないし4のアルキル基、炭素原子数1ないし4のO-アルキル基、ハロゲン原子(特に塩素原子および臭素原子)、ニトロ基、アミノ基および炭素原子数1ないし4のアルキル基により置換されたアミノ基を含む基1個またはそれ以上によりさらに置換された化合物を包含する。

ブーイデアエのプロトプラストおよび細胞の分裂および/または該プロトプラストからのコロニー形成を促進する好ましい化合物は、

O-アセトキシ安息香酸(アスピリン、アセチルサリチル酸)、

O-ヒドロキシ安息香酸(サリチル酸)、

O-メトキシ安息香酸(メチルサリチル酸)、および

O-ジメチルカルバモイル安息香酸 [O-(CO-ジメチル)-サリチル酸] である。

サリチル酸またはそれらの誘導体の培養培地

中の濃度は、通常には0.1mg/Lないし3000mg/L、好ましくは10mg/Lないし300mg/L、そして最も好ましくは約100mg/Lである。

プロトプラストが培養される培地は適当な細胞、例えばトウモロコシ、カモガヤまたはその他のイネ科植物、またはその他の(双子葉類)植物の生長によりコンディショニングを予め行った培地を含有しても良い。イネ科の籾の胚形成性懸濁体を生長させた培地が好ましい。

カモガヤの胚形成性懸濁体を生長させた培地が非常に好ましい。上記のコンディショニングを行った培地は、全培地の0%と100%(v/v)、好ましくは5%と50%(v/v)、より好ましくは30%と40%(v/v)の間の比率であって良い。

プロトプラストを12週まで、好ましくは6週まで、最も好ましくは1ないし3週の間連続培養しない固体または液体培地中で培養しても良い。本発明の好ましい実施態様において、固体培地をEP-0129688(Shillito等)に記載されたように液体培地中に置いても、またプロトプ

ラストの分裂および/またはコロニー形成を支持するようないくつかのその他の方法で処理しても良い。

プロトプラストを明所で、または好ましくは暗所で、0℃と50℃、好ましくは20℃と32℃、最も好ましくは25℃と28℃の間の温度範囲で培養する。光強度は典型的には0.1μE/m²sと200μE/m²s、好ましくは30μE/m²sと90μE/m²sの間である。

KM-8p培地を用いて得られたプレート効率は、プロトプラスト調製物の質に依存して0.5%ないし10%を変化する。プロトプラスト培養地への^{追加}30%ないし40%(v/v)のコンディショニングした懸濁培養培地の添加(それらの中で細胞生長によりコンディショニングを行い、そしてブドウ糖の添加により550mOsm/Kg H₂Oまでにした懸濁培養培地)は、プレート効率を顕著に高めないが、しかし幼プロトプラスト誘導コロニーにおける分裂過程を促進する。

本発明の好ましい実施態様において、プロト

プラストはアガロース固化培地にプレーティングされる。第一細胞分裂はプロトプラストをプレーティングして約2日後に現われる。引き続く分裂は2ないし3日毎に起こる。第一分裂が7日後に観察されることもあるという事実でわかるように、この過期は同時ではない。プレーティングして5ないし20日後、好ましくは10ないし14日後、アガロース固化培地を断片に切り、そして細胞コロニーを含有するその断片を液体培養培地に移す。この操作は「ビーズ培養法(bead culture technique)」としてこの分野では公知であり、そしてShillito等(1983)およびEP-0129688(Shillito等)に詳しく記載されている。

アガロース固化培地を切断する代わりに、アガロース培地を液化させ、そしてその液化培地を液体培養培地に移すことも可能である。この方法はAdams等(1983)に従って行うことができる。両方の場合(切断または液化)において、液体成分はブドウ糖またはショ糖を含有する

KM-8p培地に観察される良好なコロニー生長を残し得る。しかしながら、生長速度に関して最速液体成分は4g/Lカゼイン水解物を有するSH-45培地である。ビーズ培養を開始して約2ないし3週間以内に、新しい懸濁培養体をプレート中に観察することができ、アガローススタブの顕微鏡的観察により、通常表面に最も近いコロニーのいくつかは、液体中に生長したし、そしていまだアガロースに固着している細胞の小塊を遊離することがわかる。新しい懸濁液は迅速に増え、そしてもう2週間後、通常の方法で懸濁培養体として移されるか、またはカルス増殖用のSH-30プレート上にプレーティングされる。またアガロースをアガロース固化SH-45培地含有のプレート上に貼げ、そしてコロニーを生長させ得る。

従って本発明はまた細胞培養体が緑色植物を含む植物に再生され得るアーイデアエ属科のイネ科植物のプロトプラストから細胞培養体(懸濁培養体またはカルス培養体)を作製する方法

にも関する。この方法は：

(a) 植物体に再生され得るブーイデアニ属科のイネ科植物のプロトプラストを、それらが細胞コロニーを形成するまで適当な培地中で培養し、そして

(b) 細胞培養体形成を促進するための適当な培地上で前記細胞コロニーまたはそれらの一部を培養し、そして

(c) 生じる細胞培養体を単離する、ことからなる。

段階(b)は絶対に必要であるわけではない。細胞培養または胚が形成されるまでプロトプラストを段階(a)で培地中に留めることもできる。

前記細胞培養体から再生されたブーイデアニ属科のイネ科植物、特に雑性イネ科植物もまた本発明は包含する。

本発明の好ましい実施態様は、アガロース固化培地上にプロトプラストをプレーティングし、該アガロース固化培地を液化または切断し、この液化または切断した培地を液体培養培地に移

し、そして細胞コロニーが形成されるまで培養することからなる。

段階(b)の上記細胞コロニーが液体培養培地に遊離された細胞および/または細胞塊から生じる方法が好ましい。

この段階およびその他の段階で作製されたカルスおよび懸濁培養体は段階Aに記載したように凍結保存しても良い。

段階D：カルスから小植物の再生

プロトプラストから誘導されたカルス〔段階C〕、好ましくは球形カルスは、胚形成を誘導するための適当な新鮮培地上に1度またはそれ以上、好ましくは2週毎に継代培養される。適当な誘導培地は適当な濃度で糖および植物生長調節剤を含有するSH培地を包含する。

形成されるあらゆる胚を取出し、そしてそれらを成熟させさせて発芽させるのに適当な培地上にプレーティングする。適当な培地は例えば適当量の糖および植物生長調節剤を含有する変形を含むSH-30またはOMS培地を包含する。

プレートは明所に置く〔冷白色蛍光灯または日光と登録商標グロラックス(Gro-lux®)(シルバニア)蛍光灯との混合から、またはその他のあらゆる適当な蛍光灯からの10 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ ないし200 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ 〕。成熟胚はプレーティングして約2ないし5週間後に観察される。ある場合には、新鮮培地への1回またはそれ以上の余分な移し変えが胚成熟の完了には有利であり得る。この胚はさらに分化し、適当な期間、典型的には1週ないし6ヶ月、より典型的には1ないし3ヶ月後に小植物体を形成する。

また、プロトプラストから誘導されたカルス〔段階C〕、好ましくは球形カルスは、胚形成および成熟を誘導するための適当な新鮮培地上に1度またはそれ以上、好ましくは2週毎に継代培養される。適当な誘導培地は適当な濃度で糖を含みそして植物生長調節剤を含有しないDM8培地を包含するが、これに限定されない。

プレートは明所に置く〔冷白色蛍光灯または日光と登録商標グロラックス(Gro-lux®)

(シルバニア)蛍光灯との混合から、またはその他のあらゆる適当な蛍光灯からの10 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ ないし200 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ 〕。胚はさらに分化し、適当な期間、典型的には1週ないし6ヶ月、より典型的には1ないし3ヶ月後に小植物体を形成する。

段階E：植物、好ましくは雑性植物の小植物体からの獲得

段階Dに従って得られた小植物体を適当な培地、例えば生長調節剤を含有しないSH-0またはOMSに移す。また、根または菌糸生長を刺激する生長調節剤を添加しても良い。適当な生長調節剤はこの分野で公知である。小植物体はそれらが根を形成するまで前記培地上で培養される。小植物体から全てのカルスを取除くことは重要であるが、これはこの新しく形成されたカルスが小植物体の生長に阻害的であることがわかっているからである。このために、小植物体を移し変えるときに滅菌蒸留水で洗浄し得る。既に生じるカルスは一定間隔、好ましくは5

ないし30日後、より好ましくは1ないし2週毎に除去されなければならない。根形成に要する時間は典型的には約1ないし4週間、より典型的には約2週間である。良好な根系を有する小植物体を温室中の土に移し、そして徐々に硬化させる。この段階での根の十分を長さは1cmないし10cm、より典型的には2cmないし5cmの範囲であり、そして苗高は1cmないし10cm、より典型的には2cmないし5cmの範囲である。また、小植物体は耕作者の分離により不定期に試験管内で断代培養され、そして小植物体を新鮮培地、例えばSH-OまたはOMS上に置くことができる。

従って、ブーイデアエ属科のイネ科植物、好ましくは稈性植物をカルスから再生させる本発明の方法は、

(a) プロトプラストから誘導され、そして胚形成を誘導し得る培地上で植物に再生され得るブーイデアエ植物のカルスを、胚が形成されるまで培養し、

(e) プロトプラストから誘導され、そして胚形成を誘導し得る培地上で稈性植物に再生され得るブーイデアエ植物のカルスを、胚が形成されるまで培養し、

(b) 胚の成熟および発芽の誘導に適当な培地上で胚を培養し、

(c) 得られた小植物体を土に移して成熟植物を形成するには十分に生長するまで該小植物体を培養し、そして

(d) 開花調節または野外受粉で種子を得る、ことからなる。

本発明のその他の実施態様は前記カルスから再生されたブーイデアエ属科のイネ科植物、特に稈性植物である。

段階F： 外因性DNAでのプロトプラストの処理

遺伝物質内に安定に組込まれた外因性DNAの全てまたは一部を含有する細胞を作製するために、ブーイデアエのプロトプラストは外因性DNAで処理され得る。外因性DNAは本発明の範

(b) 胚の成熟および発芽の誘導に適当な培地上で胚を培養し、そして

(c) 得られた小植物体を土に移して成熟植物を形成するには十分に生長するまで該小植物体を培養する、ことからなる。

開花はHeide(1987)の記載のようにまたは使用した特定の種または変種に適當なように誘導され得る。開花を誘導する方法はブーイデアエにおいて公知である。これらの植物から産生された種子を適當な方法で処理し、発芽を誘導し、そして鉢中に蒔くか、または殺菌しそして0.8%寒天もしくはアガロース、またはグルタイトもしくはその他のあらゆる適当なゲル化剤で固化した生長調節剤を含まないMurashigeおよびSkoog培地(OMS)上にプレATINGする。種子はまたハイグロマイシン耐性特性の遺伝を決定するためハイグロマイシンBを10μg/mlと1000μg/mlの間で含有する培地上に蒔かれても良い。

従って、ブーイデアエ属科の稈性イネ科植物をカルスから再生させる本発明の方法は、

国内ではプロトプラストに添加されたあらゆるDNAからなると理解すべきである。それは形質転換される植物のものに相同であっても、また非相同であっても良い。外因性DNAはブーイデアエ属科のイネ科植物、好ましくは稈性植物中で活性なプロモーターを含有しても、または植物ゲノム内に既に存在するプロモーターを利用しても良い。外因性DNAは生じた細胞または形質転換された細胞から再生された植物の遺伝子および時に表現型を変える遺伝子を1種またはそれ以上含み得る。しかしながら、1種またはそれ以上の望ましいタンパク質物質をコードする遺伝子配列が発現され、そして1種またはそれ以上の機能的な酵素またはポリペプチドを、生じた細胞および植物内にそれぞれ産生することが望ましい。

本発明の範囲内で外因性DNAは例えば転写工程の調節に包含される非コード性調節DNA配列からなると理解すべきである。

プロトプラストの外因性DNAでの処理は以下

の刊行物に記載された方法に従って行われ得る：
 {パスコフスキー、ジュー。(Paszkowski, J.),
 等 The EMBO Journal 第3巻, 第12号
 (1984年)第2717-2722頁; 欧州特許出願
 EP-0164575 (パスコフスキー、ジュー. 等);
 シルリト, アール・ディー・(Shillito, R. D.),
 等, Bio/Technology, 第3巻(1985年)第1099
 -1103頁; ポトリクス, アイ・(Potrykus, I.),
 等, Mol. Gen. Genet., 199(1985)163-168;
 Loerz, H., et al., Mol. Gen. Genet., 第199
 巻(1985年)第178-182頁; フロム, エム・イ
 ー・(Fromm, M. E.), 等, Nature, 第319巻
 (1986年)第791-793頁; 英国特許出願GB-
 2140022 (メトラー, アイ・ジュー (Mettler,
 I. J.)); およびネグリュウ, アイ・(Negru, I.),
 等, Plant Mol. Biology, 第8巻(1987年)
 第363-373頁}。

これらの刊行物を参照により本明細書に導入
 する。

外因性DNAはあらゆる形態、例えば裸の線状

または環状DNA、リボソーム内に取り込まれた
 DNA、ミクロプラスト内のDNA、その他の植
 物プロトプラスト内のDNA、塩と複合したDNA、
 等で添加され得る。DNAの取込みは、上記の参
 考文献に記載された方法を含む当該分野で公知
 のあらゆる適当な方法により刺激され得る。

主として本発明において発現されるキメラ遺
 伝子は、価値ある特性、病原体(例えば植物病
 原菌、バクテリア、ウィルス他)に対する増加
 した耐性; 化学物質(例えば除草剤(例えばト
 リアジン、スルホニル尿素、イミダゾリノン、
 トリアゾローピリミジン、ピラホス、グリホ
 セート他)、殺虫剤またはその他の殺生物剤)
 に対する耐性; 細胞毒素(例えばハイグロマイ
 シン、カナマイシン、クロラムフェニコール他)
 に対する耐性; 不利な環境の(土壌のまたは大
 気の)影響(例えば熱、冷たさ、風、湿ましく
 ない土壌状態、水分、乾燥他)に対する耐性;
 または菌、種子、莖茎、根、茎他に保存または
 貯蔵物質の増加した形成を有する形質転換され

た植物プロトプラスト、プロトプラスト誘導組
 織および最終的にプロトプラスト誘導植物体
 を提供する遺伝子である。トランスジェニック植
 物により産生される望ましい物質は、例えばタ
 ンパク質、デンプン、糖、アミノ酸、アルカロ
 イド、フレーバー、色素、脂肪他を包含する。

細胞毒素に対する耐性は、細胞毒素を解毒す
 る酵素例えばカナマイシン、ハイグロマイシン
 およびその他のアミノグリコシド抗生物質の解
 毒のためのネオマイシンホスホトランスフェラ
 ーゼ型またはアミノグリコシドホスホトラン
 スフェラーゼ型またはグルタチオン-S-ト
 ランスフェラーゼまたはチトクロームP-450
 またはトリアジン、スルホニル尿素またはその
 他の除草剤を解毒する公知のその他の脱毒酵素
 を細胞内に発現する遺伝子により与えられ得る。
 細胞毒素に対する耐性は、細胞毒素に耐性であ
 る「標的酵素」の形態(細胞毒素の活性部位)、
 例えばスルホニル尿素またはイミダゾリノンま
 たはこの代謝段階で作用するその他の除草剤に

よる阻害に感受性でないアセトヒドロキシ酸シ
 ンターゼの形態、またはグリホセートによる阻
 害に感受性でない5-エノールピルピルシキメ
 ート-3-ホスフェート(EPSP)シンターゼの
 形態を植物体内に発現する遺伝子によっても与
 えられ得る。植物細胞内において正しい細胞の
 区画、即ち上記の例におけるクロロプラストへ
 のそれらの移動を可能にする形態のこれらの変
 更された標的酵素を発現することが有利である。

ある場合において、遺伝子産物をミトコンド
 リア、液胞内に、原形質小胞またはその他の細
 胞部分または細胞間の(アポプラスティック)
 空間にさえも打ち込むことは有利である。

あるクラスの菌に対する耐性は、例えば植物
 組織内にキチナーゼを発現する遺伝子の導入に
 より与えられ得る。多くの植物病原菌は菌糸か
 よび胞子構造の必須部分としてキチンを含み、
 例えばペンジオマイセテス(basidiomycetes)(腐
 植病原菌およびさび病菌)およびアスコマイセテ
 ス(ascomycetes)および不完全菌(アルテルナリ

ア (*Alternaria*) およびビボラリス (*Bipolaris*) を含み、エキセロヒウム チェルシカム (*Exserohilum turcicum*)、コレオトリカム (*Colletotricum*)、グレオセルコスボラ (*Gleocercospora*) およびセルコスボラ (*Cercospora*) である。キチナーゼはある種の病原体のマイセリア (*mycelia*) の成長を試験管内で阻害し得る。キチナーゼを産生する植物の葉または根は、構造的にまたは病原体侵入に対応して多くのタイプの菌の攻撃に対して保護される。構造的な発現はある種の植物で病原体の攻撃に対して正常な応答である誘導可能な発現に比べて有利にも不利にもなるが、これは新たな合成に要求される廻れの時間がなくすぐに高いレベルで存在するからである。

昆虫耐性は例えば、昆虫および/またはそれらの葉に対して毒性であるポリペプチド、例えばバチラススリンギエンシスの結晶タンパク質 (Barton 等, 1987; Voack 等, 1987) をコード化する遺伝子により与えられても良い。昆虫耐性を与えるであろうタンパク質の第二の類はプ

ロテアーゼ阻害剤である。プロテアーゼ阻害剤は植物病原構造体の共通な構造物である (Ryan, 1973)。大豆から単離された精製ボクマン・パート (*Dowman-Birk*) プロテアーゼ阻害剤はテネブリオ (*Tenebrio*) 幼虫の消化管プロテアーゼを阻害することが解っている (Birk 等, 1963)。ササグトリブシン阻害剤をコード化する遺伝子は Hilder 等 (1987) に記載されている。

プロテアーゼ阻害剤をコード化する遺伝子は植物プロモーター、好ましくは構造プロモーター例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター (Odell 等 (1985) に記載) の制御の下で、適当なベクター内に挿入され得る。

遺伝子、例えば大豆ボクマン・パートプロテアーゼ阻害剤のコード配列は Hammond 等 (1984) に記載された cDNA クローニング法を用いて得られ得る。アミノ酸を 100 個より少なく有するプロテアーゼ阻害剤例えばリマジントリブシン阻害剤の遺伝子を得る別の方法はそれを合成す

ることである。コード配列はバクテリオファージトランスレーションにより予測され、そして所望のベクターに適當な制限部位は各端部に包含される。合成遺伝子は 3' ないし 5' 塩基の重複オリゴヌクレオチドを合成することにより調整される。断片にリン酸を添加し、連結し (Maniatis 等, 1982) そして適當なベクター内にクローン化する。挿入されたクローンが正しい配向にあることは配列決定により同定され得る。プラスミド DNA を単離し、そしてプロトプラスト内への組入れに使用する (Abel 等, 1986)。

本発明はまた薬学的に活性な成分、例えばアルカロイド、ステロイド、ホルモンおよびその他の生理学的に活性な物質、およびフラビン、ビタミンおよび色素をコードする遺伝子をも含む。それ故に本発明に意図される遺伝子は、植物特有の遺伝子、例えばセイン遺伝子 (Wienand 等, 1981)、ホ乳類特有の遺伝子、例えばインシュリン遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、インターロイキン遺伝子、1-PA 遺伝子 (Pennica

等, 1983) その他、または微生物起源の遺伝子、例えば NPTII 遺伝子並びに合成起源の遺伝子、例えばインシュリン遺伝子 (Isakura 等, 1975) を包含するが、これに限定されない。

当然のこととして、転写過程の制御に包含される非コード性 DNA 配列は、ブーイデアエ亜科の植物の植物プロトプラストの形質転換のために使用できる。

種々の植物遺伝子は、植物ホルモン、熱ショック、化学物質、病原体、酸害および光不足を含む種々の内部および外部要因により誘導されることが知られている。

植物ホルモンによる遺伝子調節の例として、アブジン酸 (ABA) がワタの非常に多くの mRNA を誘導することが知られている。

もう 1 つの例において、ジベレリン酸 (GA3) はヒマの葉の種子におけるマレートシンターゼ転写および大葉期粉層における α -アミラーゼアインザイムを誘導する。

ダイズの熱ショックタンパク質遺伝子の調節

は詳細に研究されている。40℃で数時間の植物の処理により様々ないわゆる熱ショックタンパク質が新たに合成される。様々なそのような遺伝子が単離され、そしてそれらの調節は詳細に研究されている。これら遺伝子の発現は転写のレベルで主として制御されている(Willmitzerに引用されたShoffi等, 1988)。hps70遺伝子のプロモーターはネオマイシンホスホトランスフェラーゼII(NptII)遺伝子に融合され、そして熱ショックにより誘導されることがわかっている(Spena等, 1985)。

植物内の誘導可能な遺伝子のもう一つの類は、光調節化遺伝子、とりわけリボース1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ(RUBISCO)の小サブユニットのコード化遺伝子を含む。Morelli等(1985)およびHererra-Estrella等(1984)はエンドウRUBISCO遺伝子の5'配置配列がヤメラ様式で付着したポリマー遺伝子に光誘導性を付与し得ることを示している。この観察はその他の光誘導性遺伝子、例えばク

ロフィルa/b結合タンパク質まで拡大された。

トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ(adh)遺伝子は広範囲に研究されてきた。トウモロコシからadh4-s遺伝子を単離し、そして一時的に形質転換された組織が培養条件にさらされたとき、5'配置DNAの一部がヤメラリポーター遺伝子(例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ, CAT)の発現を誘導し得ることがわかった(Howard等, 1987)。

本発明の好ましい実施態様において、ブーイデアエのプロトプラストはエレクトロポレーションとポリエチレングリコール処置の組合せにより形質転換される。段階Bで得られたプロトプラストの精製直後に、エレクトロポレーションをShillito等(1985)またはEP-0164575(Paszkowski等)に記載のように行う。プロトプラストを最後の洗浄後にエレクトロポレーション緩衝液中に再懸濁する。適当なエレクトロポレーション緩衝液は適量のMgCl₂含有のマンニトール水溶液を含む。DNA水溶液をプロト

プラスト懸濁液に添加する。一実施態様において、DNAは適当な制限エンドヌクレアーゼとの処理により線状化したプラスミドpCIB709である。生成した混合物をゆっくりと混ぜる。一実施態様において、0.5Mマンニトールおよび30mM MgCl₂中のPEGの24%(w/v)溶液の容量を添加する。混合後、プロトプラストを登録商標ダイアログ(Dialog)エレクトロポレーター(Electroporator)〔西ドイツ国、D-4800デュッセルドルフ13、ハッフストラーセ54にあるダイアログゲーエムベーハー〕の室内に移し、そして約2000V/cmないし5000V/cmの初期電圧の2ないし5パルス、好ましくは3パルス、および100秒の指数微減定数を30秒間隔で適用する。試料を次にベトリ皿に移し、そして固着剤として1%(w/v)ないし25%(w/v)のアガロースを添加し、プロトプラストを培地に十分に分散させ、そしてアガロースに固着させる。形質転換されたプロトプラストのこの培養体からの結性トランスジェニックブーイデアエ植物

を含むトランスジェニック? ブーイデアエ植物は上記段階CないしFに記載のように再生される。

本発明のその他の好ましい実施態様において、ブーイデアエのプロトプラストはNegratie等(1987)に記載の方法に従って形質転換される。この場合には精製プラスミドを15mMと45mMの間のMgCl₂含有の0.5Mマンニトール中に最後の洗浄後懸濁する。DNAを水溶液中に添加し、そして次にPEGの36%(w/v)溶液の容量を添加する[Negratie等, 1987]。生成混合物をゆっくりと混合し、そして5ないし60分、好ましくは約30分、10℃と32℃の間、好ましくは室温(約25℃)で培養する。培養の間、混合物を時々振とうする。培養後、プロトプラストを洗浄し、そして適当な培養培地上にプレATINGする。適当な培養培地は固着剤として0.5%(w/v)ないし25%(w/v)アガロース、好ましくは0.6%(w/v)ないし2%(w/v)アガロースを含むKM-8p培地を含むが、これ

に限定されない。形態転換されたプロトプラス
トを培地に十分に分散させ、そしてアガロース
にゲル化させる。この培養体からの粘性のもの
を含むトランスジェニックブーイデアエ植物は
上記段階にないし且に従って再生される。

本発明の範囲内で好ましい外因性DNAは懸状
化された形態にある以下に示すプラスミド
pC18709である。

3'3221pC18709 3'3221pC18709

```

1  TCGGCGCTTT CGGTGATGAC GGTGAAAGCC TGTGACAGAT CGACGCTCCG
51  GAGACCGTCA CAGCTTGTCT GTAAAGCGAT GCGCGGAGCA GAGAACGCGC
101  TCGAGGCGCG TCAAGCGGCG TCGCGGCGTG TCGCGGCGTG CTAACTATG
151  CGCGATGAGA GCGCATGTGA CTGAGATGCG ACCATATGCG GTGTGAGATA
201  CGCGACAGAT GGTAAAGGAG AAAATACGCG ATGAGGCGCG ATTCGCGCAT
251  CAGCGCTGCG AACGTGTGGG AAGCGCGATG GGTGCGGCGC TGTCTGCTAT
301  TACGCGCAGCT GCGGAAAGCG GGTGTGCTG CAGGCGCATT AAGTTGCGTA
351  AGCGGAGGCT TTCCCGAGTG AGGAGCTGTG AAAAGCGAGC CGATGCAAT
401  GAGGTGCGGT ACCCGGAGAT CTGAGTTTAA GTACGTGATT TGTGTTTATG
451  GAATGAGAAA TTGTATTTGT AGAGGTATTT TACAAATAGA AATACATAT
501  AAGGCTTTCT TATATGCTCA ACAGATGAGC GAAACCGCTA AAGAACCGTA
551  ATTTCCCTTA TCGGGAAGCT ACTGACAGAT TACGATCCCG GTGCGCATCT
601  AGCTATATTC TTGCGCTGCG GAGGAGTGGT GCGGCGTGCG TTGCGCATCT
651  CGCGGAGTAC TTGTAGAGAG CCACTGCTGC AGACGCGCGC GCTTCTGCGC
701  CGGATTTCTG TACGCGCGCG AGTCCGCGCT CGCGATCGGA CGATTCGCTG
751  SCATCGAGCT TCGCGCGGAG CTGCACTATC GAAATTCGCG TCAACGAGC
801  TCTCATAGAG TTGCTCAAGA CCAATGCGCA GCATATACGC CGCGAGCGCG
851  GCGGATCGTG CAAGCTCGCG ATGCGTCCCG TCGAGATAGC GCGCTGCGTG
901  CTGCTATCAA GCGAGCGAGC GCGTCCGAGA GAAAGATTTG GCGAGCTCTG
951  ATGCGGAGTC CGCGAGAGTC GCGTCCGAGC AGTCAATGAG CCGCTGTTAG
1001 CGCGCATTTG CCGTCAAGAG ATTCTTGGAG CGGAAATCGC CGTCAAGAG

```

```

1051 GTGCGGAGCT TCGGCGCAT CTCTGCGGCA AAGCATGAGC TCATCGAGAG
1101 CGTCCGCGAG GAGCGGAGCT ACGGTGCTGT CATGACAGAT TTGCGAGTGA
1151 TACAGATGCG GATGAGCAAT CGCGCATATG AATGACGCGC ATCTAGCTGA
1201 TCGAGCGGAT CTTGCGGCTG CGAATCGCGC GAAACCGCTC GTCTGCGTAA
1251 GATCGCGCGC AGCGAGTGGT TCGATGCGCT CGCGAGCGCG CTGCGAGAGA
1301 CGCGGCGAGT CCGTTTCAAG CAGCTCTGCG AACCTGAGAG CCGTTCGAGC
1351 CGCGGAGATG CAATAGCTCA GCGTCTGCTG GAATTCGCGC ATGTCAGAGA
1401 CTTCGCGAAT CGCGAGCGCG CGCGATGCGA AGTTCGCGAT AAGTTCGCGA
1451 TCTTGTAGAG AAGCATGCGC GCGATGCTTT ACCCGGAGCA CATATCGAGC
1501 CCGTCTTACA TCGAGGCTGA AAGCATGAGA TTCTTCGCGC TCGAGAGAGT
1551 GCGATGAGTG GAGAGCGCTG TCGAAGTTT CCGATGAGAA CTTCGCGAGC
1601 GAGCTGCGCG TCGATGCTCA CTTTTCATCA TCTCATTTCC CGCGGCGATC
1651 CTATAGAGAG GAGATGAGAT TGTAGAGAGAG GATCTGCTAT TTGAGCGTGT

```

```

1701 CCGTTCGAAA TGAATGAGC TTCTTATAT AGAGGAGGCG TCTTGGGAG
1751 GATAGTGGCA TTGTGCGTCA TCGCTTACGT CAGTGGAGAT ATGACATGAA
1801 TCGACTTGGT TTGAGAGCTT GGTGGAAGCG TCTTCTTTT CCGCATGCTG
1851 CCGCATGCGT GCGCGTCTCA CTTCGCGAGC ACCTGCGGCA GAGGATCTCT
1901 GAAAGCATAGC CTTCCTTTTA TCGCAATGAT GGTATTTGTA GGTGCGAGCT
1951 TCGTCTTCTA CTCTCTTCTA CATGAACTCA CAGATAGCTG GCGCAATGAA
2001 TCGAGGAGCG TTTCGCGAAA TTACCTTTTG TTGAAAGTGC TCAATTTGCG

```

```

2051 TTGTGCTTTC TCGAGCTGTA TCGTTCATAT TTTCGAGTA GAGGAGAGTG
2101 TCGTGTGCGA CGATGTTGAG GAGATTTTC TTCTTGTCT TCACTGCTAA
2151 GAGACTTGTG ATGAGCTGTT CCGCATTTT CAGCGCGAGT TCTGTTAGAT
2201 CCGTGTGTTG AATCTTTGAG TCGATGCGCT TTGATTCAGT AGGAGCTACT
2251 TTCTTAGAGA CTCCAACTCT TATTACTTGC CTTCGTTTAT GAGGAGAGCG
2301 TTGAAATGCT CATATCGGAA TAGTACTTCT CATCTTGCAG AATGATATCT
2351 TTCTGCTGCT TCTGATGAGA GTTATGCTCT AATCTTTTGA CTGATCTCTT
2401 AACCTTCTTG GGAAGGATAT TGAATCTCTG GAGATTTAT CTGCGGTAGA
2451 TCGTCTTAA TCGAGCTGCT GCGTACGCGC CTCTAACCAT CTGTGCTGTA
2501 GCGTCTTCTG TGAATTTGAA GAGGCTTATC TTCTCATTTA CAGTGTGAA
2551 CATATGATCG TCGCTTTCAG CCGTCAATCT TCTTCTTAGA TCGTATGAGT
2601 AGAGGAGAGC GTCTATTTGA ATCTGCGGCG GAAAGGAGAT CTCTATGAGT
2651 CGAGCTGCGG GATTCGAGAG TCGCGGTAAT CATGCTCATG GCTGTTTCTT
2701 GTGTGAAAT GTTATCTGCT CAGATTTTCA CAGAACATAC GAGCGCGAGG
2751 CATTAAGCTT AAGGCTGCGG GTGCTTANTG AGTATGCTTA CTGATTTTAA
2801 TTGCTTTCG CCGATCTGCG GCTTTCAGT CCGGAAAGCT GTGCTGCGAG
2851 CTGATTTAAT GAGTGTGCGA ACCTGCGGCG AGAGGCGGCT TCGCTATTCG
2901 GCGCTCTTTC CCGTCTGCGG TCACTGAGCT GCTGCGGCTG GCTGTTGCGC
2951 TCGCGCGAGC GGTATCAGCT CAGTCAAGCG GGTATTTAGC GTTATTCAGA

```

```

3001 GATTCGAGAG ATACGCTAGC AAGAGGATG TATCAAAAG CCGAGCGAAA
3051 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3101 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3151 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3201 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3251 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3301 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3351 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3401 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3451 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3501 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3551 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3601 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3651 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3701 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3751 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3801 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3851 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3901 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
3951 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG

```

```

4001 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4051 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4101 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4151 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4201 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4251 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4301 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4351 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4401 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4451 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4501 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4551 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4601 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4651 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4701 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4751 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4801 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4851 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG
4901 GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG GCGGCGAGAG

```

段階G: 形質転換されたコロニーの選択

形質転換されたプロトプラストを含有するアガロース固化培地(段階D)を所、好ましくは5ないし30日間、好ましくは8ないし15日間、より好ましくは10日間暗所で、0℃と50℃の間、好ましくは20℃と32℃の間、より好ましくは25℃と28℃の間の温度範囲で培養する。固化培地を、例えば5つの切片に切り、そしてShillito等(1985)または欧州特許出願EP-0129688(Shillito等)またはShillito等(1985)、または欧州特許出願EP-0164375(Paszkowski等)に記載の方法に従って「ビーズタイプ」培養系で選択する。切片の数および大きさは問題ではない。一実施例において、これらの切片の4つを別々に適当な培地、例えば4g/4カゼイン水溶液および20μg/mlないし100μg/mlハイグロマイシンBを含有するSH-45培養培地内に入れる。第5の切片をハイグロマイシンBを含まない同様の培地に入れる(対照)。

本発明の方法はブーイデアニ亜科のイネ科植物のプロトプラストが植物、そしてより好ましくは総性の植物に再生されることを可能にする。この能力はまず第一にそのような植物のゲノム内に外因性DNAを安定に導入すること、そしてそれらの遺伝子型および表現型を覚えることを可能にする。さらに、核DNAの新規な組合せまたは核もしくはオルガネラDNAの新規な組合せを作製するために、プロトプラストを同一種または別種からのプロトプラストと融合することができる。さらに、プロトプラストは、所望の表現型のための突然変異誘発および/または選択を行うことができるクローン材料の源として使用することができる。

所望の表現型の例は、殺虫剤、除草剤、殺菌剤、殺バクテリア剤、重金属、塩、殺菌素、代謝阻害剤、細胞代謝物の構造的または機能的類似体を包含する天然または合成化学物質の毒性健康物に対する耐性を包含するが、これに限定されない。選択され得る所望の表現型のその他

約4ないし5週間後、形質転換されたと推定される細胞コロニーをアガロースから切り出し、そして適当な培養培地、例えば20μg/mlないし100μg/mlハイグロマイシンBを含有するSH-45内で培養するが、これは例えば回転振とう機上50ないし80rpmで揺り動かす。もう4ないし5週間後、新しい懸濁培養体を作る全てのコロニーを20μg/mlハイグロマイシンB含有の新しい培地に移す。新しい懸濁体を20μg/mlハイグロマイシンBの存在下で最低2回継代培養し、そしてカルスが形成されるまで上記と同様に培養する。

カルスおよび懸濁培養体、並びにこの段階で作製された材料から誘導された培養体は段階Aに記載したように凍結しても良い。

段階H: カルスから形質転換されたブーイデア植物の再生

形質転換されたブーイデア植物を、上記段階DをいしDの記載の操作に従って段階Hのトランスジェニックカルスから再生させる。

の例は不利な環境条件、例えば寒いもしくは熱い温度に対する、または生物物質、例えば病原体に対する耐性を包含する。

(実施例および発明の効果)

以下の実施例および実施例は本発明を詳細にさらに説明するが、それらの範囲を限定するものではない。

観察されない実施例実施例1: カモガヤ(Dactylis glomerata L.)の組織から胚形成性懸濁体の調製

胚形成性カルスを温室栽培のカモガヤ植物の最も幼若な葉の基部からHanning等(1982)に記載されたように開始する。その葉をクロロックス(Clrox)1:10希釈溶液(5.25%(w/v)次亜塩素酸ナトリウム溶液:水、カリフォルニア州、オークランドにあるクロロックスカンパニー)中に約10分間浸漬することにより表面殺菌し、そして次に1mmないし5mmの長さまたは直径の小断片に無菌的に切断する。

これらの断片をゲル化剤として0.8% (w/v) アガロース含有の炭素8H-30培地上にプレーティングする。カルスおよび/または胚形成性構造体が約25℃での培養で、プレーティング2ないし6週後に現われる。胚形成性カルスを2ないし4週後の新鮮な8H-30培地上での替代培養および25℃暗所中での培養により維持する。

4μM ジカムバおよび4g/l カゼイン水溶液を含有する(Gray等(1985)に記載の液体培地50ml中に胚形成性カルス約0.5g新鮮重量を移す。懸濁培養体を、金網キャップおよびパラフィルムでシールした125mlテロンダフラスコ中、回転瓶とう機上約150rpmで16時間の明(40μE/m²s)、8時間暗所中、27℃で生長させる。約4週後、大きな細胞群を約30秒間静置し、そして小さい細胞群を含有する上清を除き、そして新鮮培地50mlに移す。この方法は、小さい胚原細胞の存在に気づいてより小さい群の大きさおよびより良い質により得られるよ

そして約60gないし100gで約5分間遠心分離される12ml遠心管に分離する。プロトプラスト含有沈澱物を次いでブドウ糖で550mOsm/kg H₂Oに調整したプロトプラスト培養培地KM-8pで3回洗浄する。このときに秤上装置をさらにプロトプラストを精製するためにも良い。この場合、洗浄したプロトプラストを、シロ糖で700mOsm/kg H₂Oに調整したKM-8p培養培地10ml上に所懸する。60gないし100gで約10分間遠心分離後、界面で帝状になっているプロトプラストを細いピペットを用いて集める。放後、プロトプラストをKM-8p培養培地1mlないし2ml中に再懸濁し、そしてステンレスメッシュスクリーン(メッシュの大きさ20μm)でふるいにかける。分離したプロトプラストを集め、そして洗浄し、そして培養用のKM-8p中にまたは実施例6による胚原細胞に最適な反流圧的に調整した培地中に再懸濁する。

実施例3: カモガヤのプロトプラスト培養お

うを最も成功する培養体を用いて5ないし6週毎に繰り返される。5ないし9回の移し換えの後、懸濁体は胚形成性でない細胞が実質的になく、そして胚形成性細胞群の大部分は全く小さい(150μmないし200μm)。

実施例2: カモガヤのプロトプラストの単離および精製

ナルゲン0.2μmフィルターユニットで細胞を無菌的に回収し、そして次にベトリ皿中のプロトプラスト懸濁混合物125mlに細胞新鮮重量0.5gを添加することにより、実施例1の胚形成性懸濁培養体からプロトプラストを調製する。懸濁混合物は2% (w/v) セルラーゼLS、7mM CaCl₂ × H₂O、0.7mM NaH₂PO₄ × H₂O、5mM MES (pH 5.6)、ブドウ糖 (pH 5.6 の550mOsm/kg H₂O) からなり、そしてフィルター滅菌する。混合物を薄層(< 5μE/m²s) 光の中、約4ないし5時間、回転瓶とう機上で約50rpmで回転させる。消化物を次いでステンレス鋼のふるい(メッシュの大きさ100μm)にかけ、

よびカルスの生長

(a) 1.5% (w/v) シーブラークアガロース(米国、メイン州、ロックランドにあるPMC社、マリンコロイズディビジョン)および30%ないし40% (v/v) のコンディショニングを行った培地(炭素ナルゲン0.2μmフィルターで培地をろ過し、ブドウ糖の添加により培地を550mOsm/kg H₂Oとし、そして再びフィルター滅菌することにより3ないし4週間のカモガヤの胚形成性懸濁培養体から得られる)を含有するKM-8p培養培地中に約5 × 10⁵個プロトプラスト/mlの密度で精製プロトプラストをプレーティングする。プレートを次に28℃の一定温度で暗所に置く。1日ないし14日後、アガロースをウェッジに割り込ませ、そしてShillito等(1983)に記載された「ビーズ培養液」内に初期の注入培養液5ml当たり3% (w/v) シロ糖を有する8H-45胚原培養培地20mlを用いてする。プレートをプラットフォームシャー上に転

せ、そして $6 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の光中、約 50 rpm で攪拌する。コロニーがアガロースから生長するように新しい懸濁培養体が形成され、そして液体培地中に細胞を解放する。生成した懸濁培養細胞を寒天固化 SH-30 培地上にプレティングし、そしてカルスが形成されるまで 25℃ で暗所中に置く。

- (b) 培養培地が 100mM/5 O-アセチル-サリチル酸の添加を含む以外は上記実施例 3(a) に記載したようにプロトプラストを培養する。
- (c) 培養培地が 30mM/6 O-アセチル-サリチル酸の添加を含む以外は上記実施例 3(a) に記載したようにプロトプラストを培養する。
- (d) 培養培地がコンティシュング培地を含有しない以外は上記実施例 3(a) ないし 3(c) に記載したようにプロトプラストを培養する。

実施例 4: プロトプラスト誘導カルスからカモガヤの再生

- a) プロトプラストから誘導されたカモガヤのカルス(実施例 3 に記載したように得られた)

c) 上記 4(a) と 4(b) に記載したように小さい小植物体を得、そして 0.8% (w/v) 寒天で固化させた OMS 培地上に置き、明所で根糸を形成させる。これらを 6 ないし 12 葉期に温室に移し、そして徐々に硬化させる。

d) 上記 4(a) に記載したように小さい小植物体を得、そして 0.12% (w/v) ゲルライトと 0.4% (w/v) 寒天の組合せで固化させた SH-U 培地: OMS 培地 = 1:1 混合物上に置き、明所で根糸を形成させる。これらを 6 ないし 12 葉期に温室に移し、そして徐々に硬化させる。

実施例 5: 植物に発現可能なハイグロマイシン耐性遺伝子 [hsh^r /Hyg^r] を付与するプラスミド pCIB709、大腸菌レプリコンの構築

ハイグロマイシン耐性をコード化する構造遺伝子のコード配列は、プラスミド pLG90 (Uritz および Davies, 1983) から大きさを約 1150 塩基の BamHI 断片で単離される。プラスミド pLG90 は Linda Uritz [マサチューセッツ州、ク

を固化 SH-30 培地上で生長させ、そして 2 週間毎に継代培養を行う。形成されるあらゆる胚を切除し、そして発芽培地 (SH-0) 上にプレティングし、そして光 (45 ないし $55 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) の中に置く。

これら胚の発芽は 1 ないし 2 週で始まり、そして生じた小植物体を明所で SH-U 培地上に置き、根糸を形成させる。これらを 6 ないし 12 葉期に温室に移し、そして徐々に硬化させる。

- b) プロトプラストから誘導されたカルス(実施例 3 に記載したように得られた) を 0.24% (w/v) ゲルライトで固化させた SH-U 培地上明所 (45 ないし $55 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) で生長させ、そして 2 週毎に継代培養する。生じた小植物体を 0.12% (w/v) ゲルライトと 0.4% (w/v) 寒天の組合せで固化させた SH-U 培地: OMS 培地 = 1:1 混合物上に置き、明所で根糸を形成させる。これらを 6 ないし 12 葉期に温室に移し、そして徐々に硬化させる。

ンブリッジ、ロジャース ストリート 80 にある アプライド バイオテクノロジー (Applied Biotechnology) から入手できる。この BamHI 断片を pCIB710 (Rothstein 等, 1987) の BamHI 部位内に挿入し、プラスミド pCIB709 を構築する。プラスミド pCIB710 は CaMV の調節領域 (反復 BamHI 部位により分断されたプロモーターとターミネーター領域を有するカリフラワーモザイクウイルス 35S 転写物) を含有する。生成したプラスミド pCIB709 は ATCC に寄託され、ATCC 番号は 40428 である。

形質転換に使用する前に、プラスミド pCIB709 は制限エンドスクレーパー PvuII との処理により線状化され得る。この構築物は pUC プラスミド内にカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) からの CaMV 35S 転写物の 5' および 3' 発現信号と共にハイグロマイシン耐性 (アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ N 型) 遺伝子を含有する。pCIB709 の配列は前に示した通りである。

実施例6: エレクトロポレーションによるカ
モガヤの形質転換

- (a) プロトプラストの精製後すぐに、上記の細
状化したプラスミド pCIB709 を用い Shillito
等 (1985) に従ってエレクトロポレーション
を行う。プロトプラストの最後の洗浄後、エ
レクトロポレーション緩衝液 (0.4M マンニ
トール、6mM $MgCl_2$) 中に約 7×10^4 個プロト
プラスト/ μl の密度でプロトプラストを懸濁
する。プロトプラストを 10 μl プラスチック
遠心管中に 0.7 μl ずつ分注する。プラスミ
ド DNA (Puv^r で制限された pCIB709 を含
有する太 62 μl と超音波処理した仔牛腸腺
DNA [シグマ] の最終濃度がそれぞれ 10 μg
/ μl と 50 μg / μl) を遠心管に添加する。次
にポリエチレングリコール (PEG) 溶液 0.5
 μl (0.4M マンニトール、30mM $MgCl_2$ 、0.1
% (w/v) NLS (pH 5.6) 中の 2.4 % (w/v)
PEG 4000) を添加し、そして溶液をゆっく
り混合する。プロトプラスト懸濁液を毎回

実施例6(a)ないし6(f)を繰り返す。

- (b) MW 8000 の PEG を用いることを除いて実
施例6(a)ないし6(f)を繰り返す。
- (c) 最終PEG濃度を 10 % と 30 % (w/v) の間
とすることを除いて実施例6(a)ないし6(f)を
繰り返す。
- (d) Shillito 等 (1985) および Potrykus 等
(1985) に記載された熱ショックをさらに用
いることを除いて実施例6(a)ないし6(f)を繰
り返す。

実施例7: ポリエチレングリコール (PEG)
との処理によるカモガヤの形質転換

- (a) PEG 介在直接遺伝子導入を Negrutiu 等
(1987) に従って行う。使用する DNA は線状
化プラスミド pCIB709 である。
- プロトプラストの最後の洗浄に続いて、1
 μl 当たりプロトプラスト約 2×10^5 個の密度
で 15mM $MgCl_2$ 含有 0.5M マンニトール中
にプロトプラストを懸濁する。プロトプラス
ト懸濁液を 1 μl ずつ 10 μl プラスチック遠心

機ダイアログ エレクトロポレーター

- (Dialog[®] Electroporator) の室内に移し、
そして初期電圧 3250 V/cm の 10 パルスおよ
び 10 μs の指数破壊定数を 30 秒間隔で与え
る。試料を室から取り出し、そして直径 10 cm
のペトリ皿に入れる。1.2 % (w/v) シーブラ
ークアガロースを含有する KM-8p 培地 10
 μl を添加し、プロトプラストを培地に十分に
分布させ、そしてアガロースにゲル化させる。
- (b) 初期電圧を 3500 V/cm とすることを除いて
実施例6(a)を繰り返す。
- (c) 初期電圧を 4000 V/cm とすることを除いて
実施例6(a)を繰り返す。
- (d) 初期電圧を 5000 V/cm とすることを除いて
実施例6(a)を繰り返す。
- (e) 初期電圧を 3000 V/cm とすることを除いて
実施例6(a)を繰り返す。
- (f) 初期電圧を 2500 V/cm とすることを除いて
実施例6(a)を繰り返す。
- (g) MW 4000 の PEG を用いることを除いて実

施例6(a)ないし6(f)を繰り返す。上記実施例6aのようDNA
を添加し、そして次にPEG溶液 [0.4M マンニ
トール、0.1M $Ca(NO_3)_2$ 中の 40 % (w/v)
PEG 4000、(pH 7.0)] 0.5 μl を添加する。
溶液をゆっくり混合し、そして時々振とうし
て室温で 60 分間培養する。

洗浄溶液 1.4 μl を次に添加し、そして遠心
管の内容物をゆっくり混合する。洗浄溶液は
87mM マンニトール、115mM $CaCl_2$ 、27
mM $MgCl_2$ 、59mM KCl、7mM トリス/塩
酸および 1.7 g/l m-イノシトール、(pH 9.0)
からなる。さらに4回洗浄溶液 1.4 μl を4分
間隔で添加し、各添加後に混合する。遠心管
を次に約 60 g で約 10 分間遠心分離し、そ
して上清を捨てる。沈殿したプロトプラスト
を 1 μl の KM-8p 培養培地中に採取し、そし
て 10 cm ペトリ皿に置く。1.2 % (w/v) シー
ブラーアガロース含有の KM-8p 培地 10
 μl を添加する。プロトプラストを培地に十分
に平型に分布させ、そしてアガロースにゲル

化させる。

- (b) 洗浄溶液のpHを5.6に調整することを除いて実施例7(a)と同様に形質転換を行う。
- (c) 洗浄溶液のpHを2.0に調整することを除いて実施例7(a)と同様に形質転換を行う。
- (d) 使用するPEGがMW6000のPEGであることを除いて実施例7(a)ないし7(c)と同様に形質転換を行う。
- (e) 使用するPEGがMW2000のPEGであることを除いて実施例7(a)ないし7(c)と同様に形質転換を行う。
- (f) 使用するPEGがMW8000のPEGであることを除いて実施例7(a)ないし7(c)と同様に形質転換を行う。
- (g) Shillito等(1983)に記載されたような熱ショックをさらに用いることを除いて実施例7(a)ないし7(f)と同様に形質転換を行う。
- (h) 洗浄媒体がKOHでpH4.0としたもので、154mM NaCl、125mM CaCl_2 、5mM KCl、5mMブドウ糖からなることを除いて実施例7

(a)ないし7(g)と同様に形質転換を行う。

- (i) 洗浄媒体がKOHでpH4.0としたもので、0.2M CaCl_2 、0.1% (w/v) MESからなることを除いて実施例7(a)ないし7(g)と同様に形質転換を行う。
- (j) 洗浄媒体がKOHでpH9.0としたもので、0.2M CaCl_2 、7mMトリス/塩酸からなることを除いて実施例7(a)ないし7(g)と同様に形質転換を行う。

実施例8: エレクトロポレーションまたはPEG処理によるカモガヤのプロトプラストの形質転換

- (a) 形質転換に使用する際にpCIB709プラスミドDNAを制限酵素BglIで制限することを除いて、実施例6および7に記載したように形質転換を行う。
- (b) 形質転換に使用する際にpCIB709プラスミドDNAを制限酵素HindIIIで制限することを除いて、実施例6および7に記載したように形質転換を行う。

実施例9: エレクトロポレーションまたはPEG処理によるカモガヤのプロトプラストの形質転換

形質転換用の遮心管に分注前またはその後に、およびPEGの添加時に、プロトプラストを45℃で約5分間処理することを除いて実施例6、7または8に記載したように形質転換を行う。

実施例10: 形質転換されたコロニーの選択

- (a) プロトプラストを含有する培養プレート(ペトリ皿)を約25℃で暗所中10日間培養し、そして次に「ビーズ培養」(Shillito等、1983)用に5等分の切片に切る。4つの切片を4g/6カゼイン水溶液および20μg/mlハイグロマイシンB含有のSH-45培養液20ml中に各々入れる。第5の切片を非選択対照としてハイグロマイシンBを含まない上記培養液20mlに入れる。4ないし5週間後、ハイグロマイシンB中で生長する形質転換されたと推定されるプロトプラスト誘導細胞コロニーをアガロースから切り取り、

そして20μg/mlハイグロマイシン含有の液体SH-45培養液2mlを有する19mlペトリ皿中に入れ、回転培養という機上約50rpmで振り動かす。さらに4ないし5週間後、新しい懸濁液を作るために生長する全てのコロニーを125ml三角フラスコ中に移し、そしてハイグロマイシンB 20μg/mlを培養液に包含することを除いて親懸濁培養液と同様に生長させる。

新しい懸濁液を、4g/6カゼイン水溶液および20μg/mlハイグロマイシンB含有のSH-45培養液を用いて1ないし3週間に継代培養する。これらの懸濁液からの細胞を20μg/mlハイグロマイシンB含有の固相SH-50培養液にプレティングし、そして暗所中約25℃で培養する。プレティングした細胞から生長したカルスを2週間に新鮮培養地上に継代培養する。ハイグロマイシンBの存在下で生長する細胞を形質転換体であると見なす。

- (b) ハイグロマイシンB含有培養液中に生長するプロトプラスト誘導細胞コロニーを20μg/

25ハイグロマイシンB含有のSH-30培地の
発芽プレート上に置き、そして暗所中約25
℃で培養することを除いて実施例10(a)に記
載したように選択を行う。

**実施例11: 形質転換されたカモガヤ植物の
再生**

形質転換されていない材料のために実施例4
に記載したのと同様に形質転換されたカルスか
ら植物を再生させる。

**実施例12: カルスおよび葉組織からDNAの
抽出**

CETAB法 (Roger および Bendich, 1985)
の変法を用いて再生された植物のカルスおよび
葉からDNAを抽出する。この方法はここではカ
モガヤについて記載しているが、しかしその他
のあらゆるブーデアエ植物の組織についても有
効に適用することができる。DNA抽出のその他
の適用方法もまたこの材料からDNAを得るため
に用いることができる。

SH-U培地およびSH-30培地上に生長した

めの約30分間1:1時間の期間の後、チュー
ブを再び遠心分離し、そして上清を捨てる。沈
殿を高塩濃度TE緩衝液(以下参照)中に45
℃で約30分間再懸濁させる。

CETAB抽出緩衝液: 1%(w/v) CETAB

トリスpH8.0 (50mM)

EDTA (10mM)

NaCl (0.7M)

0.5%(w/v) PVP, 分子重36万

(PVP: ポリビニルピロリジン)

10% CETAB: 10%(w/v) CETAB

NaCl (0.7M)

沈殿緩衝液: 1%(w/v) CETAB

トリスpH8.0 (50mM)

EDTA (10mM)

高塩濃度TE: トリスpH8.0 (10mM)

EDTA (1mM)

NaCl (1M)

TE緩衝液: トリスpH8.0 (10mM)

EDTA (1mM)

カルスをドライアイスで凍結させ、そして次い
で乳鉢およびモーター中、液体窒素温度で微粉
末に破砕する。生成した粉末を液体窒素温度に
予め冷却した5mlポリエチレン遠心管に移す
(管: 本管より粉末2g)。操作の間、粉末が
決して融解しない様に注意する。粉末を1晩凍
結乾燥させ、そして次に2.2ml エッペンドルフ
チューブ内に分取する(チューブあたり0.5ml
より多い粉末)。CETAB 抽出緩衝液1mlを各
チューブに添加し、そしてそれらを60℃で約
30分間1:15分間培養する。チューブを室温
まで冷却させ、そしてクロロホルム/イソアミ
ルアルコール(24:1) 1mlを添加する。混合
後、溶液をエッペンドルフ遠心分離機中3000
rpmで約30秒間遠心分離し、そして水相を新
しいチューブに取出す。10%(w/v) CETAB
溶液1/10容量を添加し、そしてクロロホルム
抽出を繰り返す。水相を新しいチューブに取り
出し、そして等容量の沈殿緩衝液を添加する。
DNAおよびRNAを室温で沈殿させる。沈殿のた

1/10 TE: トリスpH8.0 (1mM)

EDTA (0.1mM)

実施例13: DNAの精製

実施例12でまたはその他の他のあらゆる適当な
方法で精製したDNAを多くの公知方法のいずれ
かにより精製し得る。適当な方法の例は、エチ
ジウムブロミドCsClグラジエント遠心分離、
フェノール/クロロホルムでの処理、およびエ
チジウムブロミドなしのステップグラジエント
での精製を包含するが、これに限定されない。
そのような方法はManiatis等(1982)に記載
されている。

(a) 上記実施例12からの板液を95%エタノール
(-20℃) 2容量で沈殿させる。チューブを
5000rpmで2分間遠心分離する。上
清を除去して、そして沈殿を70%エタノール
および100%エタノールで洗浄する。真空
フローベントからの空気流で緩衝液を部分的に
乾燥させる。DNAを1/10 TE緩衝液200μl
中に1晩溶かす。DNA溶液をエッペンドルフ

遠心チューブに移し、そしてBNAse(予め煮沸してDNAaseを不活性化する)の2 μ l/溶液10 μ lを添加し、そしてチューブを57℃で1時間培養する。5M NaCl 0.25容量を添加し、そして1.5M NaCl含有の30% PEG(分子量6000ないし8000)を0.4容量を添加することによりDNAを沈殿させ、そしてチューブを-20℃で約1時間保持する。チューブを5分間遠心分離し、上清を除去し、そして沈殿を冷無水エタノールで洗浄する。破菌フローベントからの空気流で簡単に乾燥し、ペレットをT₁緩衝液0.5 μ l中に再懸濁する。溶液をT₁緩衝液で平衡化したフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)で抽出し、エッペンドルフ遠心分離機で30秒間遠心し、そして水相を新しいチューブに移す。沈殿をクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)で抽出し、30秒間遠心分離し、そして水相を新しいチューブに取出す。クロロホルム抽出を繰り返す。

る。沈殿をT₁緩衝液中に再懸濁させ、エタノールで再び沈殿させ、そしてサザン分析に使用する。

実施例14: 形質転換されたカモガヤのゲノムにおける外来DNAのサザン分析による検出

サザンハイブリッド分析を実質的にManiatis等(1982)に従って行う。カモガヤのDNA[実施例13(a)および13(b)に従って精製]を制限酵素BamHIで切断し、そしてそれらの5 μ lを1列当たり載せ、1%アガロースゲル上で電気泳動し、断片の大きさに基づいてDNAを分離する。そのゲルを0.25M HCl中に約20分間置き、そして次にH₂Oですすぎ、そして次いで0.4M NaOH中に30分間置く。DNAをジーンスクリーンプラス(NESリサーチプロダクト、カタログ番号NEB976、ロット番号350GP62)に通常の法で(製品に添付される指示書の記載に従って)移動緩衝液として0.4M NaOHを用いて1晩移動させる。1晩の移動の後、フィ

す。3M酢酸ナトリウム1/10容量を添加し、続いて水相無水エタノール2容量を添加して、DNAを沈殿させる。沈殿を遠心分離により集め、そして70%および100%エタノールで洗浄し、破菌空気流中で簡単に乾燥させ、そして十分量のT₁緩衝液中に溶かし、サザン分析に使用のために0.25 μ l/μlないし1 μ l/μlの濃度とする。

(a) エサジウムプロミドなしのステップグラジエントでの精製

下層がT₁緩衝液中の5.7M CsClおよび上層がT₁中の1.0M CsClからなるCsClステップグラジエントで核酸を精製する。核酸を上層に混入させる。グラジエントを含むチューブをスウィングローター(例えばベックマン(Beckmann)8W50.1、45000rpm)で1晩遠心分離する。界面領域からDNAを集め、そしてRNAをチューブの底から回収し得る。DNAを水2容分で希釈し、そして上面沈殿例13(a)のように水相エタノール2容分で沈殿させ

ルターを取出し、2×SSC(0.5M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム)で洗浄し、そして次に風乾する。10 μ g/μl血清アルブミン(ファットフリーシグマ、カタログ番号A-4503)、7% SDS、1mM NaEDTA、および0.52Mリン緩衝ナトリウム緩衝液pH7.0を含有する緩衝液とプロットとを65℃で4時間予めハイブリッド形成させる。放射標識されたプローブをIBI「ブライム タイム」標識キットまたはあらゆるその他の方法を用い、そしてスピンカラム内でスクレオチドからプローブを分離することによるランダムプライマー法により調製する。プローブDNAは55 μ gプロモーターおよびアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼN型構造遺伝子領域を含有するpUIB709の断片からなる。ハイブリッド形成は65℃で1晩行う。プロットを次に3W洗浄緩衝液を用いて4回洗浄するが、後の2回の洗浄を65℃で行う。プロットを次に1% SDSおよび5mM NaEDTA含有の0.2×SSC中65℃で2時間洗浄する。洗ったブ

ロットを食品用フィルム（登録商標サランラップ）で包むか、またはその他のあらゆる適切なフィルムで包み、そしてX線フィルム（ニューコーク、ロヂニスターにあるイーストマンコダック（Eastman Kodak）のロダックX-Umat A 16フィルム）に露光する。現像するとpCIP 709で形質転換されたカルスおよび植物由来のDNAに対するプローブの明瞭なハイブリッド形成が見られる。pCIP 709 DNAは形質転換体の高分子量DNA内に明らかに組み込まれている。

SWハイブリッド形成緩衝液：

- 1% (w/v) ウシ血清アルブミン（脂肪なし）
- 0.5 M リン酸ナトリウム pH 7.0
- 7% (w/v) SDS
- 1 mM NaEDTA

洗浄緩液：

- 0.04 M リン酸ナトリウム pH 7.0
- 1 mM NaEDTA
- 1% (w/v) SDS
- 0.125 M NaCl

9.8×6) からなる pH 5.6 の水溶液であり、そして各々の使用の前に新たに調製する（グリセロール／プロリン／水混合物は凍結保存しても良い）。

- (3) 約1時間凍結保護溶液に細胞を晒した後、バイアルを温度 0° である液槽の表面に浸漬する。この浴はエタノールからなっている、またこの分野で公知のその他のあらゆる適切な冷媒からなっている、浴は冷媒を混合しておくための攪拌速度を備え、そして制御された速度で冷媒を冷却できる装置に連結されている。
- (4) バイアルをいったん冷媒に入れたら、温度を約 0.5°/分の速度で下げる。温度が -40° に達した時、バイアルを液槽内部に落とし、そして次いで液槽内部の中か、またはその蒸気中のいずれかに -100° を超えない温度で貯蔵する。

実施例 16： カモガヤの胚形成性懸濁培養細胞の凍結保存

実施例 15： カモガヤのカルス培養体の凍結保存

- (1) カモガヤの活細胞に生長するカルスを 8H-U 液体培地中に置く。典型的にはカルス 0.5 ないし 1 g を培地 20 ml 中に置く。カルスを含むフラスコをゆっくりと振とうし、そして回転させてカルスの餅を別々にし、そして分散させる。培養液を次に氷で冷却する。凍結保護溶液も氷上で冷却する。
- (2) 凍結保護溶液 2 等容量を 5 分間かけて添加し、そして混合物を 1 時間氷上に保つ。この間に、ラベルを貼った予冷処理した 1.8 ml プラスチック凍結保存バイアル（佐友ベークライト製のバンガード クリオス クリオジェニック バイアルス（Vanguard Cryos cryogenic vials）、カタログ番号 M84502）に 1.0 ml ずつ分取し、そして氷上に保つ。凍結保護溶液は 1 M グリセロール、1 M L-プロリン、2 M ジメチルスルホキシド（DMSO）、シグマ、カタログ番号 L2625、ロット番号 57D。

- (a)(1) 継代培養して 2 ないし 10 日後に採取したカモガヤ懸濁培養体を氷上で冷却する。凍結保護溶液は通常氷上で冷却する。凍結保護溶液は 1 M グリセロール、1 M L-プロリン、2 M ジメチルスルホキシド（DMSO）からなる pH 5.6 の水溶液である。この凍結保護溶液を使用の前に新たに調製するか、またはグリセロール／プロリン／水を凍結保存しておいても良い。
- (2) 凍結保護溶液を 5 分かけて懸濁液に添加する。細胞を凍結保護溶液中に氷上で 1 時間放置する。この時間の間または後、凍結保存バイアルに分取し、氷上に保つ。このバイアルを次いで実施例 15 におけるカルス材料に対する上記の方法と同様に処理する。
- (b) 実施例 (1) での凍結保護溶液が 1 M グリセロール、1 M ショ糖および 2 M DMSO からなる pH 5.6 の水溶液であることを除いて凍結保存を実施例 16 (a) の記載のように行う。

実施例 17: 凍結保存されたカモガヤから生長する培養体の回復

- (a) (1) 実施例 15 で調製したバイアルを液体窒素から取出す。
- (2) このバイアルを全ての氷が融けるまで室温に放置することにより融解させる。
- (3) バイアルの内容物をゲルライトまたは寒天で固化させた 8H-O 培養培地上に拡げる。典型的には融解した培養体 0.5 ml を培地 30 ml ないし 50 ml 含有の直径 10 cm のペトリ皿上に拡げる。残りの凍結保護液を細胞から分離抽出のために固体培地を傾斜させて注ぐか、または穴を培地の周辺に掘る。
- (4) 材料を培地上 77℃ で瞬間中絶する。生長は 1 ないし 4 週間で容易に視われる。カルスを次いで上記の通常の胚形成性カルスと同様に継代培養する。
- (b) 凍結保存されたカモガヤから生長する培養体の回復を、段階 (2) のバイアルを全ての氷が融けるまで約 40℃ の湯浴中でそれを振り

動かすことにより迅速に融解させることを除いて、実施例 17 (a) の記載と同様に行う。

実施例 18: トウモロコシのカルスの凍結保存

胚芽に生長するトウモロコシのカルスの凍結保存を実施例 15 においてカモガヤに対して記載したのと同様に行う。

実施例 19: トウモロコシの胚形成性懸濁培養細胞の凍結保存

トウモロコシの胚形成性懸濁培養細胞の凍結保存を実施例 16 (a) および 16 (b) においてカモガヤに対して記載したのと同様に行う。

実施例 20: 凍結保存されたトウモロコシから生長する培養体の回復

凍結保存されたトウモロコシから生長する培養体の回復を実施例 17 (a) および 17 (b) においてカモガヤに対して記載したのと同様に行う。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は液体培地中に懸濁したアガロースビーズ中で生長するカモガヤのプロトプラスト誘導コロニーである生物の形態を示す写真である。

第 2 図は 8H-O 培地上に生長するカモガヤのプロトプラスト誘導カルスから生じる小植物体である生物の形態を示す写真である。

第 3 図は容器内の 8H-O 培地上に生長するカモガヤのプロトプラスト誘導カルスからの根づいた小植物体である生物の形態を示す写真である。

第 4 図はカモガヤの小植物体である生物の形態を示す写真であって、左側の鉢の小植物体はプロトプラストから再生されたもので、右側の鉢の小植物体は野生型のものである。

第 5 図はハイグロマイシンに対する耐性を付与するためのカモガヤの形質転換に用い得るプラスミド pCIB709 を示す。プラスミド pCIB709 はブダベスト条約の要請に従って、米国、メリーランド、ロックヴィルにあるアメリカン

タイプ カルチャー コレクション (ATCC) に寄存され、そして ATCC 番号 40428 を有する。寄存日は 1988 年 2 月 12 日である。

図中、

35S prom...35S プロモーター領域

Hygro-gene...ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (APH4 型) 構造遺伝子

35S term...CamV の 35S 転写の 3' ポリアデニル化部位を含有する CamV の領域

第 6 図はプロトプラストを pCIB709 で形質転換した後に回収される異なるカモガヤからの DNA のサザン分析後の生物の形態を示す写真である。

第 1, 2 列: 制限エンドヌクレアーゼ BamHI で切断された pCIB709 10 および 2 ng。

第 4 ~ 8 列: pCIB709 でプロトプラストを形質転換した後に回収されたカモガヤのカルス培養体からの DNA を BamHI で切断したもの。

第9, 17列：プロトプラストから誘導された形質転換されていないカモガヤの対照カルスからのDNAをBamHIで切断したもの。

第10-15列：pCIB709でプロトプラストを形質転換した後回収されたカモガヤのカルス培養体からのDNAをBamHIで切断したもの。

第14列：pCIB709でプロトプラストを形質転換した後回収されたカモガヤのカルス培養体からのDNAをBamHIで切断したもの。

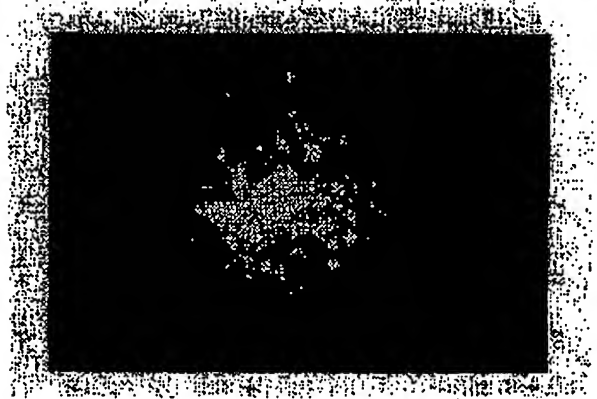
第15, 16列：pCIB709でプロトプラストを形質転換した後回収されたカモガヤのカルス培養体からのDNAをBamHIで切断したもの。

第4列：ブランク

第6, 10, 12および15列中のDNAは、フィルムの黒化により明らかによりカモガヤのゲノム内に組み込まれた外来DNAの存在を示す。

pCIB709の組み込まれたハイグロマイシン遺伝子(pCIB709のスクレオナド583-1646)のBamHI消化から予想される1063bp断片を矢印で示す。

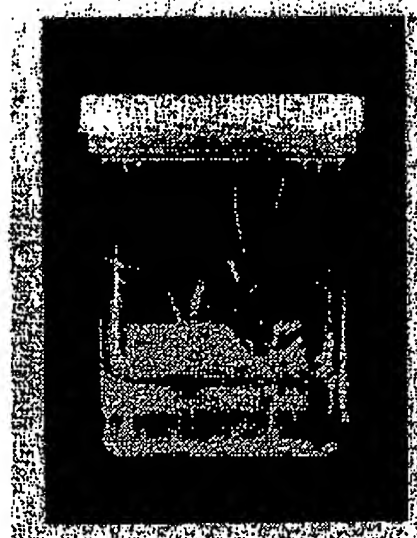
第1図



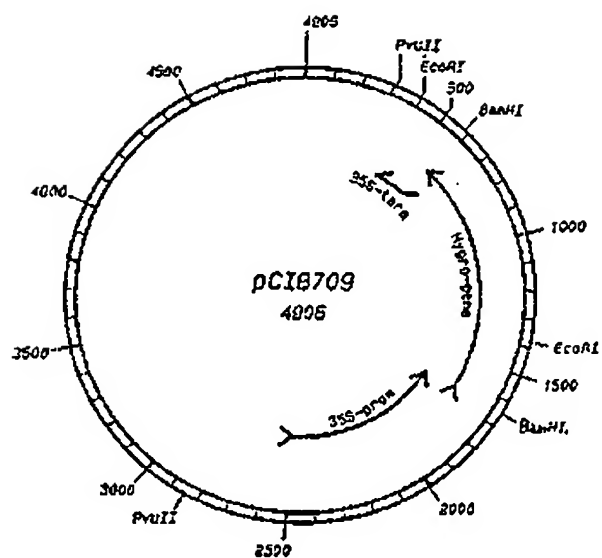
第2図



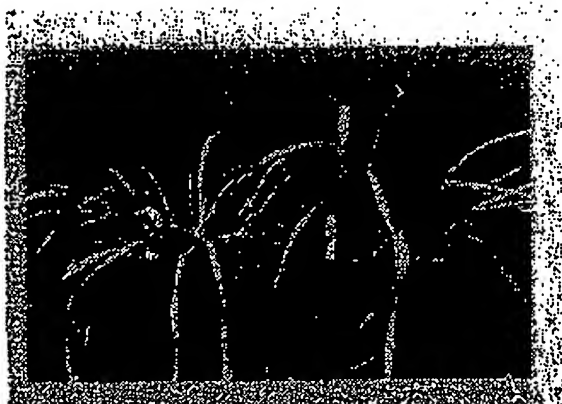
第3図



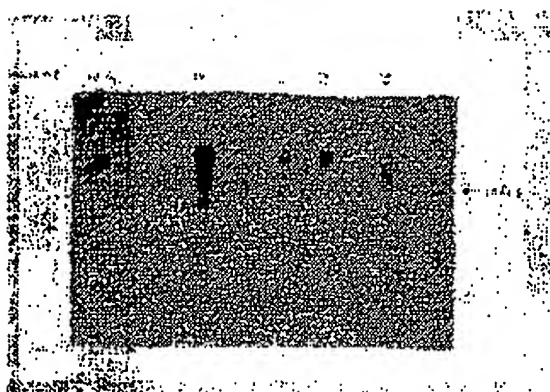
第 5 図



第 4 図



第 6 図



第1頁の続き

④Int. Cl.⁸

識別記号

序内整理番号

C 12 N 15/05
15/09

④発明者 レイモンド デー、 アメリカ合衆国、ノースカロライナ 27514, チャペル
シルリット ヒル, ローレル リッジ アパートメンツ 58

手続補正書

平成元年4月5日

特許庁長官 叩

1. 事件の表示

平成1年特許願第55962号

2. 発明の名称

プロトプラスチからブーイデアエ面科のイネ
科植物の再産

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 テバーガイギー アクテエンゲゼルンヤフト

4. 代理人

住所 東京都千代田区神田駿河台1の6

お茶の水スクエアビル

氏名 (621) 等 優美 (ほか2名)

5. 補正命令の付

「自発」

6. 補正の対象

明細書の全文

7. 補正の内容

明細書の序言(内容に喪失なし)。

方式 (印)